

Die Rolle von Ras1 bei der Regulation des polaren Wachstums in *Ustilago maydis*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Annette Bauer

aus Neustadt an der Weinstraße

Marburg/Lahn 2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Bölker von November 2006 bis September 2010 an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen:

02.05.2011

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. Susanne Önel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2011

Teile dieser Arbeit wurden vorgestellt:

- | | |
|------|--|
| 2009 | 9 th VAAM Symposium "Molecular Biology of Fungi", Universität Münster
(Poster Präsentation) |
| 2009 | „25th Fungal Genetics Conference“, Asilomar Conference Center, Pacific Grove,
CA, USA (Poster Präsentation) |
| 2008 | 4th International Conference on the Genome and Biology of <i>Ustilago</i> , Schloss
Rauischholzhausen (Poster Präsentation) |
| 2007 | 8th VAAM Symposium „Molecular Biology of Fungi“, Universität Hamburg
(Poster Präsentation) |
| 2006 | „Biology of Yeasts and Filamentous Fungi“, Johann Wolfgang Goethe
Universität Frankfurt (Poster Präsentation) |

Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht in:

Bauer, A., Mahler, M., Bölker, M. "Plasma membrane association of Ras1 protein is critical for filamentous growth but not required for viability in *Ustilago maydis*" (in Vorbereitung)

Frieser, S.H., Bauer, A., Przybilla, S.K., Bölker, M., Sandrock, B. „Recycling of Rac1 via Rdi1 and GAP-proteins during polar growth in *Ustilago maydis*“ (in Vorbereitung)

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Die Rolle von Ras1 bei der Regulation des polaren Wachstums in *Ustilago maydis*“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

Annette Bauer

Zusammenfassung

Kleine GTPasen der Ras-Familie sind molekulare Schalter, die an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt sind. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Ras1 in dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis* genauer untersucht.

Im Vordergrund der Untersuchung standen die von Ras1 aktivierten Signalwege in *U. maydis*. Es war bereits bekannt, dass während der morphologischen Transition vom hefeartigen zum filamentösen Wachstum in *U. maydis* der cAMP-Signalweg und die Pheromon-induzierte MAPK-Kaskade aktiviert werden. Auch war bekannt, dass sowohl die RhoGTPase Rac1 als auch Ras1 eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Filamenten übernehmen.

Es konnte gezeigt werden, dass Ras1 in *U. maydis* sowohl mit Komponenten des cAMP-Signalwegs als auch der MAPK-Kaskade und des Rac1-Signalwegs interagiert und diese Signalwege auch aktivieren kann. Für Ras1 konnten mit Sql2 und Tfh1 zwei RasGEFs identifiziert werden, die Ras1 an der Zytoplasmamembran aktivieren, was zu einer Stimulation der MAPK-Kaskade und des Rac1-Signalmoduls führt. Insgesamt konnte der kleinen GTPase Ras1 die Rolle eines zentralen Koordinators von Filamentbildung in *U. maydis* zugewiesen werden.

Die intrazelluläre Lokalisation von Ras1 war ein weiterer Forschungsschwerpunkt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Ras1 abhängig von seiner Palmitoylierungssequenz an der Zytoplasmamembran oder an Endomembranen lokalisiert. Während die essentiellen Funktionen von Ras1 von Endomembranen aus reguliert werden, war die Lokalisation von Ras1 an der Zytoplasmamembran essentiell für filamentöses Wachstum. Ras1 aktiviert sowohl an der Zytoplasmamembran als auch an Endomembranen das Rac1-Signalmodul. An Endomembranen ist Ras1 an der Regulation der Vakuolenmorphologie beteiligt und wird dort sehr wahrscheinlich durch den GEF Tfh1 aktiviert.

Abkürzungen und Fachbegriffe

AB	Antibiotikum	kD	Kilodalton
Amp	Ampicillin	mantGDP	N-methylantranoyl-GDP
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MM	Minimalmedium
ATP	Adenosin-Triphosphat	N-Terminus	Amino-Terminus
bp	Basenpaar	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
BSA	„bovine serum albumin“	ORF	„open reading frame“
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat	PCR	„polymerase chain reaction“
Cbx	Carboxin	PD	„potato dextrose“
C-Terminus	Carboxy-Terminus	PEG	Polyethylenglycol
CTP	Cytosin-Triphosphat	RA	Ras-Assoziationsdomäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat	RNase	Ribonuklease
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure	rpm	„rotations per minute“
GAP	„GTPase activating protein“	RT	Raumtemperatur
GDI	„Guaninenukleotide dissociation inhibitor“	SDS	„sodium dodecyl sulfate“
GEF	„Guaninenukleotide exchange Faktor“	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
GTP	Guanosin-Triphosphat	T _m	mittlere Schmelztemperatur
H ₂ O bidest.	zweifach destilliertes Wasser	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Hyg	Hygromycin	TTP	Thymidin-Triphosphat
kb	Kilobase	üN	über Nacht
		UV	Ultraviolettes Licht
		wt	Wildtyp
		X-Gal	5-Bromo-4-chloro-l-indol-β-D-galactosid
		z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Kleine GTP-bindende Proteine.....	1
1.1.1	Überblick.....	1
1.1.2	Struktureller Aufbau.....	2
1.1.3	Regulatoren kleiner GTPasen.....	4
1.2	Die Familie der Ras-Proteine	5
1.2.1	Überblick über humane RasGTPasen.....	5
1.2.2	Posttranslationale Modifikationen der RasGTPasen.....	7
1.2.3	RasGTPasen in pilzlichen Modellorganismen	8
1.2.4	Überblick über Rho/RacGTPasen.....	11
1.3	Der Modellorganismus <i>Ustilago maydis</i>	12
1.3.1	Überblick.....	12
1.3.2	Lebenszyklus.....	13
1.3.3	Genetische Regulation des Kreuzungssystems.....	15
1.4	Signalnetzwerke der Ras- und RacGTPasen in <i>Ustilago maydis</i>	16
1.4.1	Die Rolle der Ras-Proteine	16
1.4.2	Rac1 in <i>U. maydis</i>	19
1.5	Zielsetzung.....	21
2	Ergebnisse	23
2.1	Ras1 ist an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt.....	23
2.2	Dominant aktives Ras1 ^{G18V} induziert die Bildung multipler Septen.....	25
2.3	Ras1 aktiviert den cAMP-Signalweg	27
2.3.1	Ras1 und Ras2 interagieren mit der Adenylatzyklase Uac1.....	27
2.3.2	Die Aktivität des cAMP-Signalweges wird durch dominant aktives Ras1 erhöht.....	28
2.4	Die MAPK-Kaskade als potentiell Ziel der Ras-Aktivität.....	29

2.4.1	Die Aktivität der Pheromon induzierten MAPK-Kaskade wird durch Überexpression von <i>ras1^{G18V}</i> erhöht.....	30
2.4.2	Ras1 interagiert mit Kpp4	30
2.5	Ras1 aktiviert das Bem1/Cdc24/Rac1/Cla4-Signalmodul.....	31
2.5.1	Überexpression von Ras1 führt zur Aktivierung des Signalmoduls	31
2.5.2	Dominant aktives Ras1 beeinflusst die Lokalisation von Cdc24	32
2.5.3	Ras1 und Cdc24 interagieren vermutlich nicht direkt	33
2.6	Die Filamentinduktion von Ras1 und Rac1 benötigt das Vorhandensein der MAPK-Kaskade.....	34
2.7	Die MAPK-Kaskade verknüpft den Ras1-Signalweg mit dem Rac1-Signalweg.....	36
2.7.1	Das RA-Domänenprotein Ubc2 interagiert mit den RhoGTPasen Rac1 und Cdc4236	
2.7.2	Cdc24 wird in Abwesenheit von Ubc2 nicht mehr abhängig von Ras1 ^{G18V} an die Membran lokalisiert.....	37
2.8	Die intrazelluläre Lokalisation der RasGTPasen wird durch eine Modifikation ihrer C-terminalen Bereiche bestimmt	38
2.8.1	Die Ras1-Proteinsequenz beinhaltet ein C-terminales Palmitoylierungssignal	39
2.8.2	Eine Punktmutation im Palmitoylierungssignal führt zur Lokalisation von Ras1 an Endomembranen.....	40
2.9	Für die essentielle Funktion von Ras1 ist keine Lokalisierung an der Zytoplasmamembran erforderlich	41
2.9.1	Die Überexpression von Ras1 ^{CCSS} supprimiert den letalen Phänotyp der Ras1-Depletion.....	41
2.9.2	Die Palmitoylierungsstelle von Ras1 ist in <i>U. maydis</i> nicht essentiell.....	42
2.10	Die Lokalisation von Ras1 an der Zytoplasmamembran ist essentiell für filamentöses Wachstum	44
2.10.1	Die Überexpression von Rac1 führt in palmitoylierungsdefekten Ras1-Stämmen nicht zu filamentösem Wachstum	45
2.10.2	In Abwesenheit von Ras1 an der Zytoplasmamembran induziert das bE/bW-Heterodimer kein filamentöses Wachstum.....	45
2.11	Die Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul ist unabhängig von der Palmitoylierung von Ras1	47

2.11.1	Ras1 ^{G18VCCSS} aktiviert das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul.....	47
2.11.2	Palmitoylierungsdefektes, dominant aktives Ras1 führt zur Lokalisation von Cdc24 an Endomembranen.....	48
2.12	Aktivatoren von RasGTPasen in <i>U. maydis</i>	49
2.12.1	Charakterisierung der Spezifität von RasGEF-Proteinen in <i>U. maydis</i>	50
2.12.2	Die RasGEFs Sql2 und Tfh1 katalysieren den Nukleotidaustausch an Ras1	51
2.12.3	Der Ras1 GEF Sql2 aktiviert das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul.....	52
2.12.4	Der Ras1-spezifische GEF Tfh1 ist ein Regulator der Zellmorphologie.....	53
2.12.5	Die Überexpression von Tfh1 führt zur Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmoduls	54
2.12.6	Ale1 ist ein GEF spezifisch für Ras2.....	55
3	Diskussion.....	57
3.1	Das filamentöse Wachstum in <i>U. maydis</i>	57
3.1.1	Ras1 aktiviert den Rac1-Signalweg während des filamentösen Wachstums.....	58
3.1.2	Die Rolle der MAPK-Kaskade während des filamentösen Wachstums.....	60
3.2	Die essentiellen Funktionen von Ras1 werden von Endomembranen aus gesteuert..	62
3.3	Die Aktivatoren der RasGTPasen in <i>U. maydis</i>	65
3.4	Ausblick.....	68
4	Material.....	71
4.1	Allgemeine Materialien und Bezugsquellen	71
4.1.1	<i>U. maydis</i> -Stämme.....	71
4.1.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	73
4.1.3	Hefestämme.....	74
4.1.4	Chemikalien	74
4.1.5	Kits.....	76
4.1.6	Enzyme und Proteine	77
4.1.7	Sonstige Materialien.....	77
4.1.8	Puffer und Lösungen.....	78
4.1.9	Puffer für die Aufreinigung von Proteinen	81

4.1.10	Medien zur Kultivierung von <i>U. maydis</i>	82
4.1.11	Medien zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	84
4.1.12	Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	85
4.1.13	Nukleinsäuren	85
4.1.14	λ -DNA	92
5	Methoden	93
5.1	Anzucht von Mikroorganismen.....	93
5.1.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	93
5.1.2	Anzucht von <i>U. maydis</i>	93
5.1.3	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	94
5.2	DNA-Präparationen.....	94
5.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> - analytischer Maßstab	94
5.2.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> - präparativer Maßstab.....	95
5.2.3	Präparation DNA aus <i>U. maydis</i> für PCR.....	95
5.2.4	Präparation von DNA aus <i>U. maydis</i> für Southern Blot	96
5.3	Amplifikation und Klonierung von DNA.....	96
5.3.1	Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion	96
5.3.2	Restriktions-Analyse von DNA	97
5.3.3	Dephosphorylierung von DNA.....	95
5.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	95
5.3.5	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Plasmid-DNA	96
5.3.6	Herstellung von Deletionskonstrukten für <i>U. maydis</i> mittels Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	96
5.4	Analyse von DNA.....	97
5.4.1	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	97
5.4.2	Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese.....	97
5.4.3	DNA-Sequenzierung.....	98
5.4.4	Transfer und Detektion von DNA auf Membranen.....	98
5.4.5	Herstellung radioaktiver DNA-Sonden	99

5.4.6	Präparation von RNA.....	100
5.5	Analyse von RNA.....	101
5.5.1	Auftrennung von RNA durch Agarosegelelektrophorese.....	101
5.5.2	Transfer und Detektion von RNA auf Membranen.....	101
5.5.3	Quantifizierung der Bandenintensität.....	102
5.6	Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen.....	103
5.6.1	Produktion von rekombinanten Ras-Proteinen	103
5.6.2	Aufreinigung von RasGTPasen aus <i>E. coli</i>	104
5.6.3	Produktion und Aufreinigung von rekombinanten RasGEFs aus <i>E. coli</i>	104
5.7	Analyse von Proteinen.....	104
5.7.1	Proteinextraktion aus <i>U. maydis</i>	104
5.7.2	Konzentrationsbestimmung.....	105
5.7.3	SDS-Gelelektrophorese	105
5.7.4	Transfer und Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot) ..	106
5.7.5	Gesamtproteinnachweis durch Anfärben des SDS-Geles	107
5.7.6	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels GST <i>pulldown-assays</i>	107
5.8	<i>In vitro</i> -Untersuchung von Ras-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren.....	108
5.9	Transformationen.....	109
5.9.1	Herstellung elektro-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	109
5.9.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	109
5.9.3	Elektro-Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	110
5.9.4	Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	110
5.9.5	Protoplastierung von <i>U. maydis</i>	111
5.9.6	Transformation von <i>U. maydis</i> -Protoplasten.....	111
5.9.7	Integration von Vektoren in den genomischen <i>ip</i> -Locus.....	112
5.10	Mikroskopie	112

1 Einleitung

1.1 Kleine GTP-bindende Proteine

1.1.1 Überblick

Kleine GTPasen der Ras-Superfamilie kontrollieren in der Zelle ein breites Spektrum biologischer Prozesse. Dies reicht von der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und der Mikrotubuli-Dynamik bis hin zur Kontrolle der Endozytose und des Vesikel-Transports. Diese Funktionen machen kleine GTPasen zu entscheidenden Regulatoren der Zelladhäsion und Zellpolarität. GTPasen fungieren dabei als molekulare Schalter, die Abläufe in der Zelle oder Antworten auf Umweltsignale regulieren können. Sie kommen in allen Eukaryoten von Pilzen bis zum Menschen vor. Sie wurden zuerst in humanen Karzinomen identifiziert, wo sie in mutierter Form unkontrollierte Zellproliferation auslösen. Dies macht kleine GTPasen zu einem höchst interessanten Thema der Molekularbiologie. Die prominentesten Vertreter Ras, Cdc42 und Rac1 sind sowohl in humanen Zelllinien als auch in weiteren eukaryotischen Modellorganismen sehr gut untersucht, doch viele Fragen über die genaue zeitliche und räumliche Regulation sind noch immer ungeklärt (Takai et al, 2001).

Die Funktion als molekularer Schalter beruht auf der Fähigkeit der GTPasen zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand zu wechseln. Im aktiven Zustand sind kleine GTPasen in der Lage mit Effektoren zu interagieren und dadurch deren zelluläre Funktionen zu beeinflussen (Bourne et al, 1990; Hall, 1990; Takai et al, 2001). Die Regulation der kleinen GTPasen erfolgt durch drei Protein-Klassen; den Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs = Guanin nucleotide exchange factors), den GTPase-aktivierende Proteinen (GAPs) und den Guaninnukleotid-Dissoziierungs-Inhibitoren (GDIs) (siehe Abbildung 1). Um aus dem inaktiven in den aktiven Zustand zu wechseln, katalysieren GEFs den Austausch von GDP zu GTP (Schmidt & Hall, 2002; West et al, 1990). GAPs hingegen stimulieren die intrinsische Hydrolyseaktivität der GTPasen und überführen diese damit in den inaktiven Zustand (Gibbs et al, 1984). Als weiterer Regulator können GDIs den GTPase-Zyklus an mehreren Stellen beeinflussen. GDIs halten die GTPasen im inaktiven

Zustand und blockieren den Nukleotidaustausch durch Inhibierung der GDP-Freisetzung. Außerdem beeinflussen GDIs über die Bindung an den hydrophoben C-Terminus die intrazelluläre Lokalisation der GTPasen (Sasaki et al, 1990).

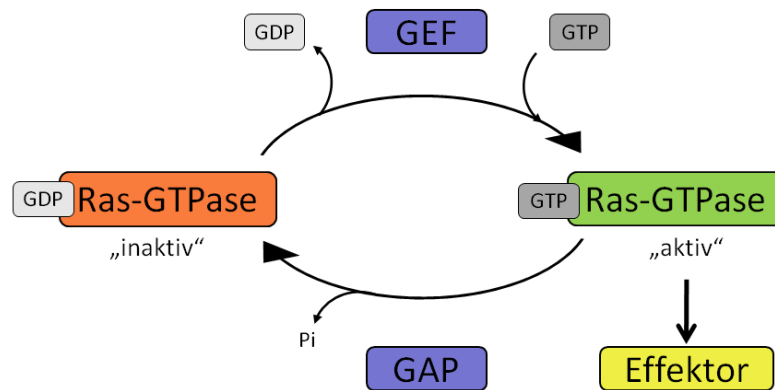


Abbildung 1: Kleine GTPasen sind molekulare Schalter

Kleine GTPasen fungieren als molekulare Schalter, da sie zwischen einer aktiven, GTP-gebundenen Konformation und einer inaktiven, GDP-gebundenen Form wechseln können. Aktiviert werden kleine GTPasen durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und inaktiviert werden sie durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs).

1.1.2 Struktureller Aufbau

Die Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen gliedert sich in die Ras-, Rho-, Sar/Arf-, Ran- und Rab-Familien (Takai et al, 2001). Die Primärstruktur von kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie ist hoch konserviert und ihre Aminosäuresequenzen weisen untereinander mit 30-50 % Identität eine sehr hohe Ähnlichkeit auf (Hall, 1990). Alle GTPasen enthalten konservierte Domänen, die sowohl für die Interaktion mit GTP und GDP als auch für die GTPase Aktivität nötig sind (Bourne et al, 1991; Takai et al, 1992; Valencia et al, 1991). Dies ermöglicht experimentelle Modifikationen, wie beispielsweise die Einführung von Mutationen, die einen konstitutiv aktiven oder konstitutiv inaktiven Phänotyp erzeugen. So bewirkt der Austausch der Aminosäure Glycin an der Position 12 gegen Valin (G12V) bzw. der Austausch von Glutamin nach Leucin an der Position 61 (Q61L) in humanen RasGTPasen eine konstitutiv aktive Form, die immer im GTP gebundenen Zustand vorliegt. Der Austausch von Threonin zu Asparagin an der Position 17 (T17N) führt zu einer dominant negativen Form, in welcher der Austausch von GDP zu GTP inhibiert ist (Feig & Cooper, 1988; Ziman et al,

1991). Durch den Vergleich der Kristallstrukturen im GTP- und GDP- gebundenen Zustand konnten zwei flexible Regionen identifiziert werden: Switch I und Switch II (Milburn et al, 1990) (siehe Abbildung 2). Diese Regionen unterliegen einer Konformationsänderung nach Austausch von GDP zu GTP, da die konservierten Aminosäuren Tyrosin 37 der Switch I-Region und Glycin 62 der Switch II-Region Wasserstoffbrücken mit dem Phosphat des GTP ausbilden (Ihara et al, 1998; Wei et al, 1997). Durch diese Konformationsänderung wird die Bindungsaffinität der GTPasen an die Effektoren erhöht (Pai et al, 1989). In der Switch I Region konnten Effektor-spezifische Bindestellen in Cdc42/Rac1 GTPasen identifiziert werden (McCormick & Wittinghofer, 1996).

Kleine GTPasen der Ras-, Rho- und Rab-Familien tragen zusätzlich noch eine C-terminale Konsensussequenz, die sogenannte CAAX-Box. Diese wird posttranslational durch Proteolyse, Methylierung und einer Prenylierung modifiziert. Diese postranslationale Modifikation ist für die Lokalisation der Proteine an der Membran und für die Bindung von Regulatoren und damit für die korrekte Aktivierung ihrer Effektoren notwendig (Casey & Seabra, 1996; Glomset & Farnsworth, 1994; Magee et al, 1992; Takai et al, 1992; Zhang & Casey, 1996).

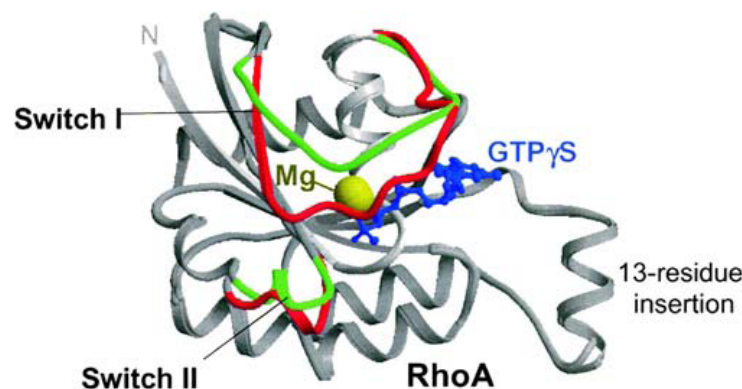


Abbildung 2: Switch Regionen der RhoGTPasen (Hakoshima, 2003)

Abgebildet ist RhoA mit markierten Switch-Regionen in GTP-gebundenem, aktiven Zustand (rot) und in GDP-gebundenem, inaktivem Zustand (grün).

1.1.3 Regulatoren kleiner GTPasen

Der spontane Austausch von GDP zu GTP erfolgt bei kleinen GTPasen nur sehr langsam und muss deshalb von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) stimuliert werden. GEFs binden an die GDP-gebundene GTPase, worauf das GDP entlassen wird und ein binärer Komplex aus GEF und GTPase zurückbleibt. In diesem Komplex kann dann die freie Nukleotidbindestelle durch GTP besetzt werden; die GTPase ist so in ihrem aktiven Zustand. Von den bisher bekannten GEFs gibt es einige, die eine hohe Spezifität gegenüber bestimmten GTPasen aufweisen, während andere ein größeres Substratspektrum besitzen. Alle Rho/Rac-spezifischen GEFs enthalten eine DH Domäne (=Dbl Homologie), meist direkt gefolgt von einer PH Domäne (=Pleckstrin Homologie) (Lemmon & Ferguson, 2000; Rebecchi & Scarlata, 1998). Die DH Domäne ist für die katalytische Aktivität notwendig, während die PH Domäne für die Lokalisation der GEFs an der Membran zuständig ist. Bei RasGEFs wird die katalytische Domäne als RasGEF-Domäne und die membranbindende Domäne als N-terminales Motiv beschrieben.

Im Gegensatz zu GEFs inaktivieren GAPs kleine GTPasen, da sie deren intrinsische GTPase Aktivität stimulieren. GAPs binden an die GTPasen nur im GTP-gebundenen Zustand. Darauf erfolgt eine 20° Drehung des GAPs relativ zur GTPase. Dies ermöglicht dem sogenannten Arginin-Finger des GAPs, die GTPase-Domäne zu erreichen und zu aktivieren, was zur GTP-Hydrolyse führt (Lamarche & Hall, 1994).

GDI sind ebenfalls Regulatoren, die den nicht aktivierten Zustand von kleinen GTPasen der Rho-Familie aufrechterhalten. RhoGTPasen, die durch den modifizierten C-Terminus an der Membran lokalisieren, können von den entsprechenden GDIs über deren Immunglobulin ähnliche C-terminale Domäne gebunden werden. Dadurch werden die GTPasen aus der Membran herausgelöst. Eine N-terminale Domäne der GDIs verhindert darüber hinaus den Austausch von GDP zu GTP und sorgt dafür, dass die im Zytoplasma lokalisierte GTPase nicht aktiviert werden kann (Fukumoto et al, 1990; Golovanov et al, 2001).

1.2 Die Familie der Ras-Proteine

1.2.1 Überblick über humane RasGTPasen

Zu der Ras-Familie kleiner GTPasen gehören Ras-, Rab- und Ral-Proteine. RasGTPasen gehören zu den am intensivsten untersuchten kleinen GTPasen. Ras-Proteine regulieren diverse zelluläre Signalkaskaden, die wiederum für die Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose entscheidend sind. In über 60 % unterschiedlicher humaner Karzinome wurden Mutationen gefunden, die in einer erhöhten Aktivierung von Ras-Effektoren resultieren (Garnett & Marais, 2004). RasGTPasen sind an der Übertragung von Umwelteinflüssen oder Wachstumsfaktoren zu zellulären Antworten beteiligt. Wachstumsfaktoren können als extrazelluläre Stimuli Rezeptortyrosin-Kinasen aktivieren, die sich *in trans* phosphorylieren. Die phosphorylierten Tyrosine dienen als Andockstelle für SH2-Domänen-Proteine wie Grb2. Diese Adapterproteine rekrutieren weitere Effektoren im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, u. a. auch den RasGEF SOS, der dann in der Lage ist Ras zu aktivieren (Li et al, 1993; Olivier et al, 1993). In seiner aktiven Form interagiert Ras direkt über eine Ras-Bindedomäne (RBD) mit der Raf-Kinase, der ersten Kinase einer MAP-Kinase-Kaskade (Mitogen-aktivierte-Proteinkinase Kaskade). Durch die Interaktion zwischen der RasGTPase und der Raf-Kinase wird diese an die Zytoplasmamembran lokalisiert und die MAPK-Kaskade aktiviert. Die letzte Kinase der Kaskade ist ERK, die extrazellulär regulierte Kinase. ERK wird nach der Aktivierung in den Nukleus transloziert, um dort Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung zu aktivieren. Auf diese Weise kann Ras über die Aktivierung einer MAPK-Kaskade die Genexpression beeinflussen (Huang et al, 2011). Neben der Raf-Kinase konnten eine Reihe weitere RBD enthaltende Proteine ebenfalls als Ras-Effektoren beschrieben werden (siehe Abbildung 3). Dazu gehört die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K), die in der Zelle sekundäre Botenstoffe wie Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PI3,4P_2) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PI3,4,5P_3) generiert und dadurch die Proteinkinase B (PKB) aktiviert. PKB ist wiederum zum Schutz der Zellen vor Apoptose fördernden Signalen zuständig (Welch et al, 2003). Ein weiterer gut untersuchter Effektor in humanen Zellen ist Tiam, der GEF einer RacGTPase (Buchsbaum et al, 2003; Rodriguez-Viciana et al, 1994). Ras-Effektoren wie Tiam führen nach ihrer Aktivierung durch Ras nicht nur zur Aktivierung einer nachgeschalteten GTPase (Rac), sie können

ebenso durch Determination der Signalspezifität von Rac auch Einfluss auf deren weitere Effektorselektion nehmen (Buchsbaum et al, 2003). Es wurden weiterhin Ras-Effektoren beschrieben, die über eine Ras-Assoziationsdomäne (RA-Domäne) mit Ras interagieren (Ponting & Benjamin, 1996). Hierzu gehören unter anderem GEFs von RalGTPasen wie RalGDS und Rin als auch der GEF der GTPase Rab5, aber auch die Phospholipase-C Familienmitglieder PLC- ϵ und Rassf1 (Barbieri et al, 1998; Boettner et al, 2003; Boettner & Van Aelst, 2002; Feig, 2003; Han et al, 1997; Lim et al, 2005; Wennerberg & Der, 2004). Des Weiteren wurde Rain, auch RasIP1 genannt, als Ras-Effektor beschrieben. Rain ist der bis jetzt einzige Effektor von Ras, der nicht von Zytoplasmamembran lokalisiertem Ras aktiviert wird sondern von Endomembran lokalisiertem Ras (Mitin et al, 2004). Rain/RasIP1 wird in Endothelzellen exprimiert und ist ein essentieller Faktor bei der Entwicklung des vaskulären Endothels in Mäusen und Fröschen (Xu et al, 2009).

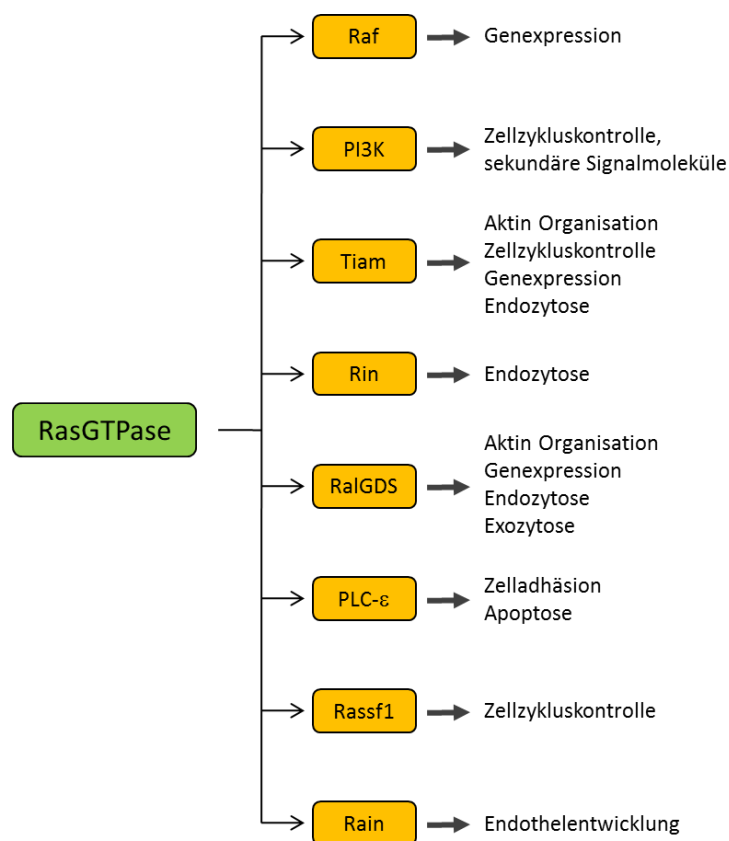


Abbildung 3: Effektoren humaner RasGTPasen

Eine Vielzahl von Effektoren humaner RasGTPasen und deren zelluläre Funktionen wurden bereits charakterisiert. Die prominentesten Effektoren wurden in gelb dargestellt und deren zellulären Funktionen aufgeführt.

1.2.2 Posttranslationale Modifikationen der RasGTPasen

Im humanen Genom finden sich drei Ras-Isoformen, H-Ras, K-Ras und N-Ras. Sie zeigen nicht nur unterschiedliche Lokalisierungen innerhalb der Zelle, es wurden auch Effektoren identifiziert, die zwischen den drei Isoformen diskriminieren können. Ras Proteine besitzen eine C-terminale CAAX-Box, bestehend aus einem Cystein, zwei aliphatischen Aminosäuren und einer beliebigen Aminosäure. Diese Proteinsequenz dient der Erkennung durch zytosolische Prenyltransferasen, die Isoprenlipide über eine stabile Thioetherbindung an das Cystein binden (siehe Abbildung 4). Daraufhin wird das Protein als Substrat von Endoproteasen erkannt, die die AAX Aminosäuren entfernen (Boyartchuk et al, 1997). Anschließend wird die Carboxylgruppe des prenylierten Cysteins von einer Carboxyl-Methyltransferase mit einer Methylgruppe verestert (Clarke et al, 1988; Dai et al, 1998; Hrycyna et al, 1991). Eine weitere membranbindende Domäne liegt direkt vor der CAAX-Box. Bei N-Ras und H-Ras finden sich in dieser Region zwei Cysteine, die palmitoyliert werden. K-Ras hingegen enthält dort als Signal eine polybasische Region, die aus mehreren Lysinen besteht (Hancock et al, 1990; Lobo et al, 2002). Die Modifikation der Ras-Isoformen geschieht jedoch nicht vollständig im Zytoplasma oder an der Plasmamembran, da einige der benötigten Enzyme an Endomembranen wie dem ER oder an der Golgi-Membran lokalisiert sind. K-Ras wird durch eine Farnesyltransferase farnesyliert, am ER durch die Endoprotease Rce1 prozessiert und dann zur Zytoplasmamembran transportiert. N-Ras und H-Ras hingegen werden vom ER noch zur weiteren Palmitoylierung über den Golgi-Apparat und über Vesikel zur Zytoplasmamembran transportiert (Rocks et al, 2005). Die Palmitoylierung ist reversibel. Durch Entfernen der Palmitoylierung kommt es zum Ablösen der GTPase aus der Plasmamembran.

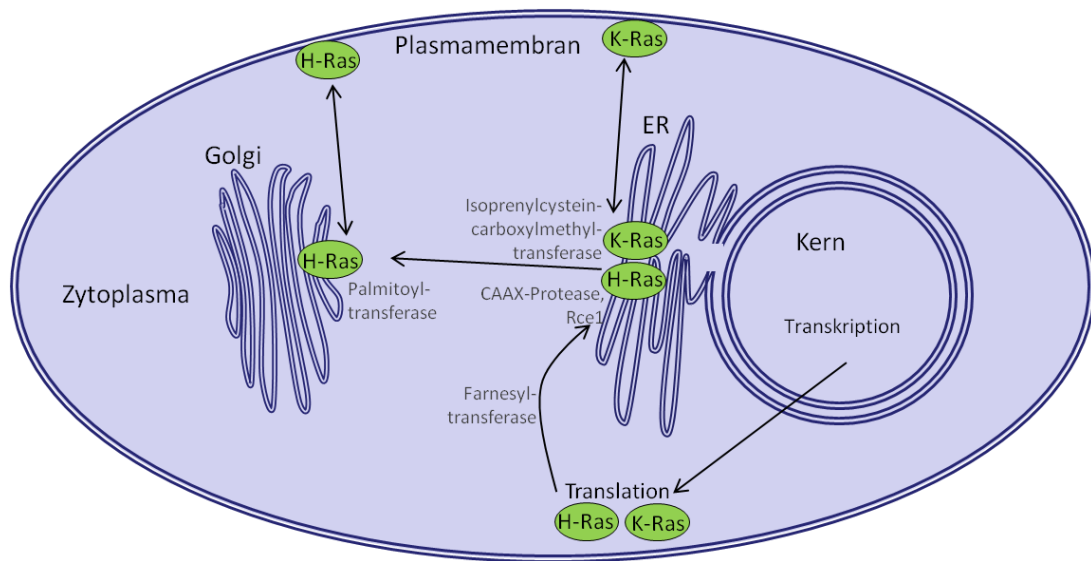


Abbildung 4: Intrazelluläre Lokalisation humaner RasGTPasen

Schematische Darstellung der intrazellulären Lokalisation und der posttranslationalen Modifikationen der humanen RasGTPasen H-Ras und K-Ras.

1.2.3 RasGTPasen in pilzlichen Modellorganismen

Bei Pilzen wurde bisher noch nicht von mehr als zwei *ras*-Genen in einem Organismus berichtet, jedoch besitzen alle pilzlichen Mikroorganismen zumindest ein *ras*-Homolog. Das Genom der Bäckerhefe *S. cerevisiae* enthält zwei Ras-Homologe, Ras1 und Ras2. In *S. cerevisiae* erfüllen Ras1 und Ras2 redundante Funktionen (Kataoka et al, 1984). Bei der Wahrnehmung von Nährstoffen spielen Ras1 und Ras2 eine entscheidende Rolle, sie sind an der Aktivierung des cAMP-Signalwegs beteiligt (Santangelo, 2006). Der cAMP-Signalweg besteht in *S. cerevisiae* aus der Adenylatzyclase CYR1 und aus der ProteinkinaseA (PKA), die wiederum aus der regulatorischen Untereinheit Bcy1 und den katalytischen Untereinheiten Tpk1, Tpk2 und Tpk3 besteht. Als Aktivatoren von CYR1 wurden sowohl Ras1 und Ras2 als auch das heterotrimere G-Protein Gpa2 beschrieben (Rolland et al, 2000). Der Ras/PKA-Signalweg ist für das Wachstum von *S. cerevisiae* auf allen C-Quellen essentiell (Folch-Mallol et al, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass in *S. cerevisiae* Ras1 und Ras2 mit CYR1 in ihrer GTP-gebundenen Konformation interagieren und diese aktivieren (Toda et al, 1985). Ras2 ist auch für die Basalaktivität der Adenylatzyklase notwendig. Eine Erhöhung der Glukosekonzentration führt zu einem Anstieg der CYR1 Aktivität. Der GEF, der den Nukleotidaustausch an Ras2 katalysiert, ist Cdc25. Wie Ras2 durch die

Glukosekonzentration reguliert wird, ist derzeit jedoch noch nicht bekannt. Es konnte jedoch noch ein weiterer Mechanismus zur Aktivierung des cAMP-Signalwegs beschrieben werden. Hierbei wird der cAMP-Signalweg durch den zytosolischen pH-Wert reguliert. Eine vakuoläre ATPase, die in der Lage ist Vakuolen anzusäuern, stellt einen Sensor des zytosolischen pH-Wertes dar. Diese pH-abhängige Regulation ist für eine vollständige Aktivierung des cAMP-Signalwegs unerlässlich (Dechant et al, 2010).

Eine weitere Rolle spielt Ras2 in *S. cerevisiae* bei der Regulation der MAPK-Kaskade während des filamentösen Wachstums. Unter Nährstoffmangel zeigen haploide Zellen kein Knospenwachstum sondern kohäsives, invasives Wachstum (Mösch et al, 1999; Roberts & Fink, 1994). Diploide Zellen bilden Pseudohyphen aus, die ähnlich zu haploiden Zellen unter Nährstoffmangel auf Agar invasiv wachsen. Dieser morphologische Wechsel wird auf molekularer Ebene durch den cAMP-Signalweg und die MAPK-Kaskade reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass Ras2 in seiner aktiven Konformation diesen morphologischen Wechsel in *S. cerevisiae* induzieren kann (siehe Abbildung 5) (Kübler et al, 1997; Lorenz & Heitman, 1997; Mösch & Fink, 1997; Mösch et al, 1996).

Die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* enthält lediglich ein Ras-Homolog, Ras1 (Fukui et al, 1986). In *S. pombe* reguliert Ras1 die MAPK-Kaskade, die ein Bestandteil der Signaltransduktion nach Pheromonstimulation ist (Wang et al, 1991). Hier aktiviert Ras1 die MAPKKK Byr2. Wird dieser Signalweg unterbrochen, sind die Zellen steril und weisen eine verlängerte Zellmorphologie auf. Der zweite Signalweg, an dem Ras1 in *S. pombe* beteiligt ist, reguliert die Zellpolarität. Hierbei interagiert Ras1 mit Scd1, einem Cdc24-Homolog und GEF für Cdc42 (Chang et al, 1994). Wird dieser Signalweg unterbrochen, runden sich die Zellen ab. Ihr Kreuzungsverhalten bleibt jedoch unbeeinträchtigt. Es konnten zwei RasGEFs identifiziert werden, welche Ras1 aktivieren. So katalysiert der RasGEF Efc1 den Nukleotidaustausch an Ras1 während der Regulation der Zellpolarität und der RasGEF Ste6 aktiviert Ras1 bei der Wahrnehmung von Pheromon (Papadaki et al, 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nicht nur die RasGEFs entscheidend dafür sind, welchen Signalweg Ras1 reguliert. Beide Signalwege werden von distinkten zellulären Kompartimenten aus gesteuert. So wird der Ste6-Ras1-Byr2 Signalweg von Ras1 an der Zytoplasmamembran aktiviert, während der Efc1-Ras1-Scd1-Cdc42 Signalweg von Ras1 an Endomembranen reguliert wird (Onken et al, 2006).

Der filamentöse Ascomycet *Aspergillus fumigatus* exprimiert die beiden Ras Homologe, RasA und RasB, die unterschiedliche, jedoch überlappende Funktionen in der Zelle erfüllen. RasA ist kein essentielles Protein. *rasA*-Deletionsstämme zeigen verlangsamtes Zellwachstum, Defekte während der Konidienkeimung und während der Ausbildung der Hyphen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass RasA die Kernverteilung reguliert und dass die Deletion von RasA zu einer modifizierten Zellwand führt. RasB ist ebenfalls an der Konidienbildung beteiligt (Fortwendel et al, 2008; Fortwendel et al, 2004).

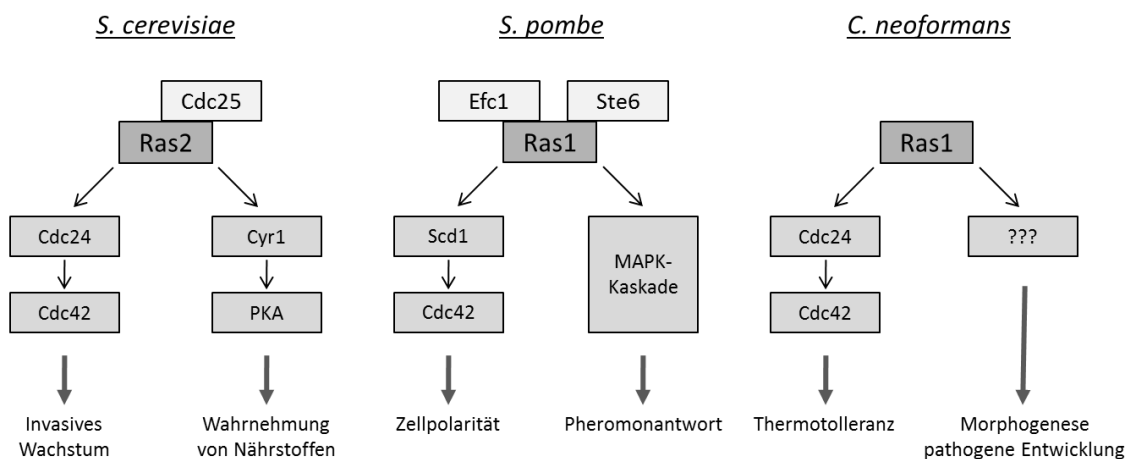


Abbildung 5: Signalweiterleitung von RasGTPasen bei *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *C. neoformans*

Dargestellt sind die bekannten GEFs und Effektoren von RasGTPasen in den pilzlichen Modellorganismen *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *C. neoformans*.

Der Basidiomycet *Cryptococcus neoformans* enthält wie *U. maydis* ebenfalls, zwei Ras Homologe, Ras1 und Ras2. Es konnte gezeigt werden, dass Ras1 in *C. neoformans* nicht essentiell ist, jedoch zelluläre Prozesse wie Morphogenese, Thermotoleranz und die pathogene Entwicklung reguliert. Ras1-Deletionsmutanten können ihren sexuellen Lebenszyklus nicht mehr durchlaufen, da die Pheromongene nicht mehr exprimiert werden und die Pheromonantwort gestört ist. Des Weiteren sind Ras1-Deletionsstämme thermointolerant. Bei erhöhten Temperaturen (27°C) ist *C. neoformans* ohne Ras1 nicht mehr in der Lage zu wachsen, die Zellen arretieren ohne Knospe und weisen ein depolarisiertes Aktinzytoskelett auf. Die Thermotoleranz wird

von Ras1 über den RhoGEF Cdc24 und die GTPase Cdc42 vermittelt. Es konnte mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems eine direkte Interaktion von Ras1 und dem konstitutiv aktivem Ras1 mit Cdc24 nachgewiesen werden, das konstitutiv inaktive Protein Ras1^{S23N} interagiert nicht mit Cdc24 (Nichols et al, 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ras1 C-terminal palmitoyliert wird und dass diese Palmitoylierung notwendig ist, um Ras1 an der Zytoplasmamembran zu lokalisieren. Diese Prenylierung ist wichtig, um die Morphogenese und die Thermotoleranz zu vermitteln. Die Signalweiterleitung während der pathogenen Entwicklung ist palmitoylierungsunabhängig und wird dementsprechend von an Endomembranen lokalisiertem Ras1 vermittelt (Nichols et al, 2009).

1.2.4 Überblick über Rho/RacGTPasen

RacGTPasen gehören zu den am besten untersuchten GTPasen der Rho-Familie und sind an der Regulation wichtiger Ereignisse wie Zellpolarität, Zellmotilität, Endozytose und Zellzykluskontrolle beteiligt. RacGTPasen sind in Eukaryoten sehr weit verbreitet. Im humanen System wurden Rac1, Rac2 und Rac3 beschrieben. Sie sind für die embryonale Entwicklung essentiell. Es zeigte sich, dass Rac1 ubiquitär exprimiert wird (Didsbury et al, 1989) und für die Organisation des Zytoskeletts verantwortlich ist. In Fibroblasten reguliert Rac1 die Bildung von Lamellipodien und *membrane ruffles* (Ridley & Hall, 1992). Lamellipodien sind zur Fortbewegung gebildete breite, flache Zellausstülpungen, *membrane ruffles* sind hingegen faltige Strukturen der Zytoplasmamembran, die bei der Rückbildung der Lamellipodien entstehen. Rac2 wird ausschließlich im hämatopoetischen System (Didsbury et al, 1989; Shirsat et al, 1990) und Rac3 nur im Nervensystem exprimiert (Haataja et al, 1997). Die Funktion von Rac1 ist unentbehrlich für die PDGF-bedingte Chemotaxis (Anand Apte & Zetter, 1997) und für das Verschließen von Wunden in einfachen Zelllagen (Fenteany et al, 2000; Nobes & Hall, 1999). Weitere Funktionen erfüllt Rac1 bei invasivem Wachstum auf Kollagen und bei der Zellwanderung auf Fibronectin (Berrier et al, 2000; Clark et al, 1998; Price et al, 1998). Rac1 ist darüber hinaus durch die Regulation des Cyclins D1 an der Zellzykluskontrolle mitbeteiligt (Joyce et al, 1999; Westwick et al, 1997). In Phagocyten und Pflanzen konnte gezeigt werden, dass Rac1 sowohl für die Produktion reaktiver Sauerstoffmoleküle, als auch für die Induktion eines Apoptose ähnlichen Mechanismus in Reis mitverantwortlich ist (Kawasaki et al, 1999).

Die intensive Erforschung von RacGTPasen in Säugerzellen führte zur Identifizierung einer Vielzahl von Effektoren, die an der Rac bedingten Regulation des Aktinzytoskelettes, der Zelladhäsion, Regulation der Genexpression, der Zellproliferation, der Endozytose und der Immunantwort beteiligt sind. So ist bekannt, dass Rac1 mit einigen PAKs (p21-aktivierte Serin/Threonin Kinasen) über deren CRIB-Domäne (Cdc42 und Rac interaktive Bindedomäne) interagiert (Brown et al, 1996). Die CRIB-Domäne ist Teil einer autoinhibitorischen Region, welche die Kinasedomäne im inaktiven Zustand hält. Diese Inhibition wird durch die Bindung von Rac1 aufgehoben (Bishop & Hall, 2000). Ein weiterer bekannter Effektor von Rac1 ist POR1 (Partner of Rac), der spezifisch mit Rac1 interagiert und an der Bildung der *membrane ruffles* beteiligt ist (Van Aelst et al, 1996). Auch die Lipid-Kinasen PI3K und PI5K wurden als Rac-Effektoren identifiziert. Die PI5K wurde als direkter Rac1-Effektor in Säugerzellen identifiziert, deren Rac1 vermittelte Aktivierung essentiell für die Aktin-Assemblierung ist (Ren & Schwartz, 1998; Tolia et al, 2000). Ein weiterer Effektor von Rac1 ist IQGAP, der an der Regulation der Zell-Zell-Interaktion beteiligt ist (Fukata et al, 1997). In dimorphen Pilzen wurden Rac1-Homologe bis jetzt in *Yarrowia lipolytica* (Hurtado et al, 2000), *Penicillium marneffe* (Boyce et al, 2003), *U. maydis* (Mahlert et al, 2006), *Colletotrichum trifolii* (Chen & Dickman, 2004), *C. neoformans* (Gorfer et al, 2001; Vallim et al, 2005), *Claviceps purpurea* (Tudzynski & Scheffer, 2004) und in dem Ectomykorrhizen-formenden, filamentösen Pilz *Suillus bovinus* (Gorfer et al, 2001) näher charakterisiert. Bei fast allen dieser Pilze ist Rac1 an der Filamentbildung und auch an der Regulation der Zellpolarität beteiligt. In den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* konnte kein Rac1-Homolog identifiziert werden.

1.3 Der Modellorganismus *Ustilago maydis*

1.3.1 Überblick

Ustilago maydis ist ein Hemibasidiomycet und gehört zu den Brandpilzen. Er ist fakultativ biotroph und phytopathogen. *U. maydis* hat ein sehr enges Wirtsspektrum mit Mais und Teosinte als einzigen Wirtspflanzen. Für den komplexen Lebenszyklus von *U. maydis* ist eine Pflanzeninfektion unerlässlich. Sie führt zur Bildung großer Gallen an Stängeln, Blättern oder Früchten der Pflanzen, in denen sich die diploiden Teliosporen von *U. maydis* entwickeln (Banuett, 1992) (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: *U. maydis* induzierte Gallen an Blättern, Kolben und Stängeln

Nach der Infektion von Maispflanzen durch *U. maydis* entstehen große Gallen, in denen die Teliosporen reifen.

Seit 2002 ist die genomische Sequenz öffentlich zugänglich (<http://mips.gsf.de>). *U. maydis* wird auch als Modellorganismus für genetische und zellbiologische Fragestellungen genutzt und ist auch ein geeigneter Modellorganismus für Studien an kleinen GTPasen (Mahlert et al, 2006). Im Genom von *U. maydis* konnten sechs Gene für RhoGTPasen identifiziert werden, wobei es sich um Gene für die hoch konservierten GTPasen Rho1, Rho2, Rho3, Rho4, Cdc42 und Rac1 handelt. Weiterhin konnten drei Vertreter der Ras-Familie, Ras1, Ras2 und Rsr1 durch Sequenzvergleich nachgewiesen werden. Von diesen kleinen GTPasen wurden bis heute nur die RhoGTPasen Cdc42, Rac1 und Rho1 sowie die beiden RasGTPasen Ras1 und Ras2 näher untersucht (Hlubek et al, 2008; Lee & Kronstad, 2002; Mahlert, 2006; Mahlert et al, 2006; Pham et al, 2009).

1.3.2 Lebenszyklus

Damit *U. maydis* seinen Lebenszyklus durchlaufen kann, müssen zwei saprophytisch wachsende, haploide Sporidien unterschiedlichen Kreuzungstyps fusionieren (siehe Abbildung 7). Die Erkennung der Kreuzungspartner verläuft über Kreuzungstyp-spezifische Pheromonsignale (Banuett & Herskowitz, 1989). Die Sporidien arretieren nach Pheromonperzeption ihren Zellzyklus und bilden, dem Pheromongradienten folgend, aufeinander zuwachsende Konjugationshyphen aus (siehe Abbildung 7) (Boelker et al, 1992; García-Muse et al, 2003; Snetselaar et al, 1996). Diese fusionieren und trennen sich dann durch Septenbildung von den Sporidien ab, wodurch eine dikaryotische Hyphe entsteht (Snetselaar & Mims, 1993). Diese Hyphe ist obligat

parasitär und kann mit Hilfe von Apressorien in die Pflanze eindringen. Etwa 5 Tage nach der Penetration der Pflanze bilden sich Gallen aus stark vergrößerten pflanzlichen Zellen (Snetselaar & Mims, 1992). In diesem pflanzlichen Gewebe vermehrt sich *U. maydis*, es findet Karyogamie statt und schließlich kommt es zur Trennung der Hyphen in kürzere Fragmente und Einzelzellen (Banuett & Herskowitz, 1996). Diese Einzelzellen sind in einer gallertartigen Masse eingebettet und entwickeln sich zu diploiden Teliosporen. Teliosporen können durch Wind und Wasser verbreitet werden und mehrere Jahre überdauern bis es zur Auskeimung kommt. Beim Auskeimen der Teliosporen bildet sich ein Promycel, in welchem die Meiose stattfindet (Christensen, 1963). Nach der Meiose schnüren sich die haploiden Sporidien vom Promycel ab. Diese haploiden Sporidien können nun wieder auf Pheromonsignale von Kreuzungspartnern reagieren und der nächste Zyklus kann beginnen.

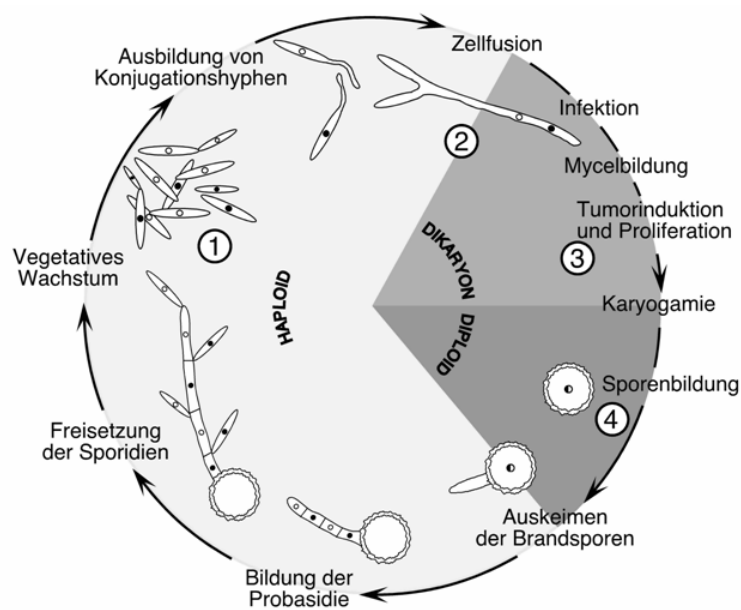


Abbildung 7: Lebenszyklus von *U. maydis* (Müller, 2003)

U. maydis ist ein Hemibasidiomycet, der sich vegetativ und sexuell vermehren kann. Während der vegetativen Wachstumsphase wächst er hefeartig durch Knospung und vermehrt sich saprophytisch (1). Bei sexuellem Wachstum verschmelzen zwei Sporidien zu einem infektiösen, filamentösem Dikaryon (2). Nach Infektion einer Wirtspflanze induziert das Dikaryon die Bildung von Gallen in denen sich *U. maydis* vermehrt (3). Nach der Karyogamie trennen sich die Hyphen in Einzelzellen und entwickeln sich zu diploiden Teliosporen (4), die dann als haploide Sporidien auskeimen.

1.3.3 Genetische Regulation des Kreuzungssystems

Der dimorphe Wechsel von der nicht pathogenen, haploiden Sporidie zur pathogenen, dikaryotischen Hyphe wird in *U. maydis* von den beiden Kreuzungstyploci *a* und *b* kontrolliert. Der *a*-Locus ist biallelisch und ist verantwortlich für die Expression eines Pheromon/Rezeptor-Systems. Dies ist sowohl für die Erkennung der Kreuzungspartner als auch für deren Fusion essentiell (Banuett & Herskowitz, 1989; Spellig et al, 1994). So kodiert der *a1*-Locus für das Mfa1 Pheromon sowie den Pra2 Rezeptor, während der *a2*-Locus die Mfa2- und Pra1- Bildung ermöglicht (Bölker et al, 1992). Im Gegensatz zum *a*-Locus ist der *b*-Locus multiallelisch. Der *b*-Locus ist für die Erhaltung eines stabilen Dikaryons, für die Pathogenität und gemeinsam mit dem *a*-Locus für das filamentöse Wachstum zuständig. Er besteht aus zwei Genen, *bE* und *bW*, die für Transkriptionsfaktoren mit Homeodomäne kodieren (Kämper et al, 1995; Schulz et al, 1990). Es wurden schon über 25 unterschiedliche Allele des *b*-Locus identifiziert. Um ein stabiles Dikaryon bilden zu können, müssen die beiden fusionierenden Sporidien unterschiedliche *b* Allele tragen. Ist dies nicht der Fall, ist das Dikaryon instabil und die Hyphe apathogen. Die von den Genen *bE* und *bW* kodierten Proteine bilden Heterodimere, sofern sie von unterschiedlichen *b*-Allelen stammen. Das Heterodimer aus *bE* und *bW* fungiert als transkriptioneller Regulator der Gene, welche für die Pathogenität des Dikaryons essentiell sind (Kämper et al, 1995). Nach Wahrnehmung des Pheromonsignals kommt es zur Stimulierung der Expression der *b*-Gene. An der Übertragung des Pheromonsignals sind zwei intrazelluläre Signalwege beteiligt (siehe Abbildung 8). Dies ist zum einen der cAMP-Signalweg, der aus der Adenylatzyklase Uac1 und der ProteinkinaseA (PKA) besteht. Die PKA besteht wiederum aus einer regulatorischen Untereinheit Ubc1, die nach Interaktion mit cAMP ihre inhibitorische Wirkung auf die katalytische Untereinheit der PKA Adr1 verliert. Der zweite Signalweg, der für die Weiterleitung des Pheromonsignals essentiell ist, ist eine MAP-Kinase-Kaskade. Sie besteht aus der MAP-Kinase-Kinase-Kinase Kpp4/Ubc4, der MAP-Kinase-Kinase Fuz7/Ubc5 und der MAP-Kinase Kpp2/Ubc3 (Andrews et al, 2000; Müller, 2003). Die Aktivierung beider Signalwege führt zur mehrfachen Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Prf1 der unter anderem die Expression der *b*-Gene induziert (Hartmann et al, 1996; Kaffarnik, 2003; Zarnack et al, 2008). Die genaue Regulation, insbesondere die Aktivierung der beiden Signalwege ist jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Es konnte gezeigt werden, dass der cAMP-Signalweg über das heterotrimere G-Protein Gpa3 aktiviert wird (siehe Abbildung 8). Für die MAPK-Kaskade wird eine Aktivierung durch Ras2 und dessen potentiellen RasGEFs Sgl2 postuliert (Lee & Kronstad, 2002; Müller et al, 2003).

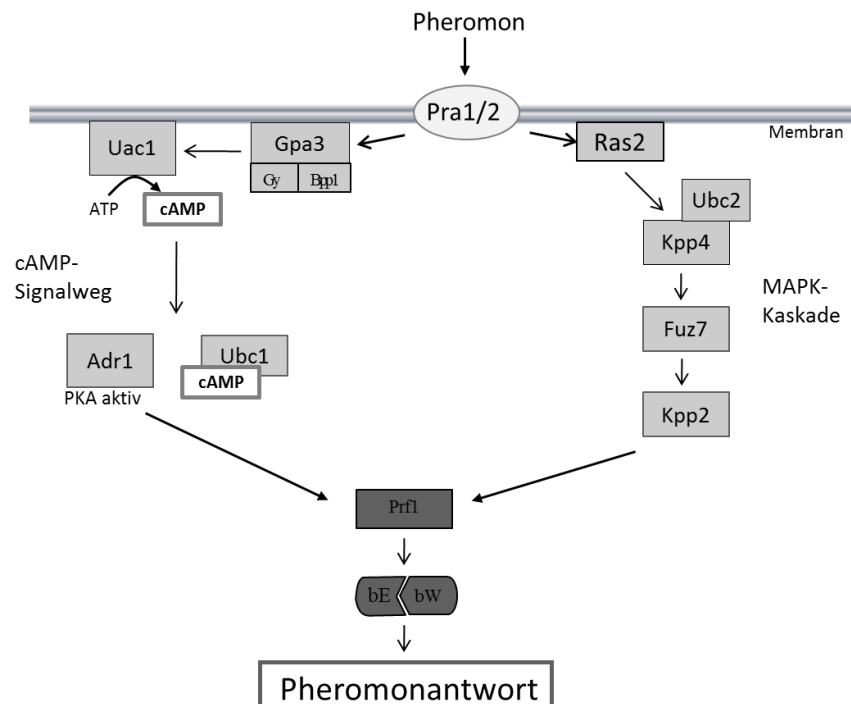


Abbildung 8: Genetische Regulation des Kreuzungsvorgangs

Der *a*-Locus ist für die Expression des Pheromon/Rezeptor-Systems zuständig, welches über den cAMP-Signalweg und die MAPK-Kaskade den Transkriptionsfaktor Prf1 aktiviert. Prf1 induziert daraufhin die Expression des *b*-Locus. Die Bildung von bE- und bW-Heterodimeren führt zu filamentösem Wachstum und zu einer Stabilisierung des Dikaryons.

1.4 Signalnetzwerke der Ras- und RacGTPasen in *Ustilago maydis*

1.4.1 Die Rolle der Ras-Proteine

In *U. maydis* konnten bislang mehrere zelluläre Funktionen für Ras1 und Ras2 identifiziert werden. Ras1 und Ras2 sind an der Filamentbildung und an der Regulation der Septierung von *U. maydis* beteiligt. Des Weiteren regulieren die beiden Ras-Proteine die morphologische Entwicklung, die Bildung der Zellpolarität, die Zytokinese und Ras1 darüber hinaus die Zellkernverteilung (Lee & Kronstad, 2002; Mahlert, 2006).

Dies ist erkennbar an konditionalen Deletionsmutanten, welche in Abwesenheit von Ras1 kugelrunde Zellen bilden und eine unregelmäßige Kernverteilung zeigen. Die Überexpression von Ras1 führt abhängig von der Expressionsstärke zur Filamentbildung oder zu verstärkter Septierung. Ähnliche Phänotypen zeigen Zellen, die konstitutiv aktives Ras1^{Q67L} exprimieren. Auch in diesem Falle ist die Ausprägung dieses Phänotyps abhängig von der Expressionsstärke und führt entweder zur Bildung von sehr kurzen Zellverlängerungen oder aber zu einer extremen Septierung und Abrundung der Zellen (Mahlert, 2006) (siehe Abbildung 9). Die Expressionsstärke hängt von der Kopienzahl des Überexpressionskonstrukts im Genom ab. Bei geringer Kopienzahl unterscheidet sich die Ausbildung der Filamente zwischen *wt-ras1* und *ras1^{Q67L}*. Die Filamente von *ras1^{Q67L}* Zellen sind wesentlich kürzer und etwas dicker. Sind das wt-Ras1-Protein und das Ras1^{Q67L}-Protein in hoher Kopienzahl vorhanden, zeigen die Zellen mit starker Septierung und Abrunden einen ähnlichen Phänotyp (Mahlert, 2006).

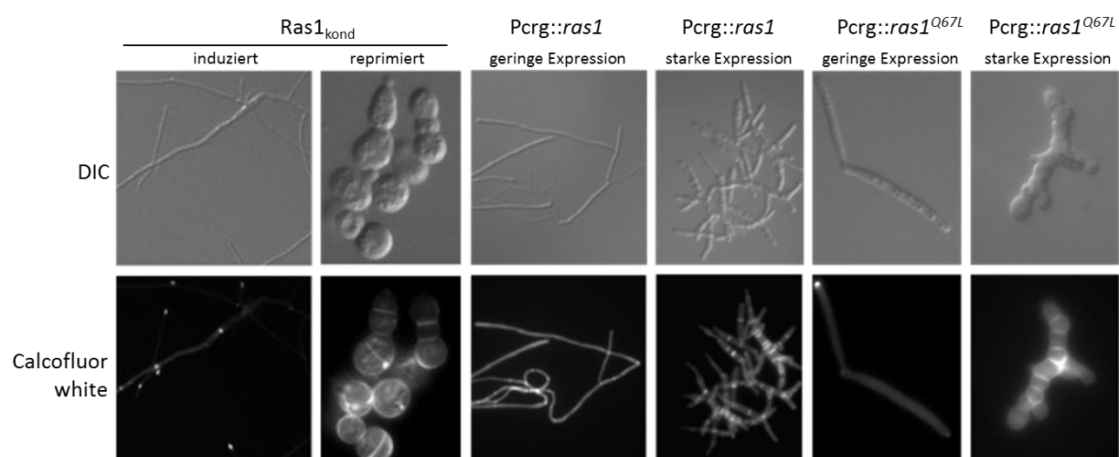


Abbildung 9: Phänotypen von Ras1-Mutanten (M. Mahlert, 2006)

Die konditionalen Ras1-Mutanten wachsen auf induzierendem Arabinose-Medium filamentös, da sie *ras1* stärker exprimieren als der Wildtyp. Auf Glukose wachsen sie apolar und stark septiert. Auf Glukose wird *ras1* in diesem Stamm nicht mehr exprimiert. Geringe Überexpression von *ras1* führt zur Filamentbildung, starke Überexpression zu kürzeren, dickeren Zellen, die sehr stark septiert sind. Geringe Expression von Ras1^{Q67L} führt zu kurzen, dicken Filamenten, starke Expression zu apolaren stark septierten Zellen. In allen hier gezeigten Stämmen sind die Ras1-Konstrukte unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotors. Stämme mit geringer und starker Expression unterscheiden sich darin, wie häufig das jeweilige Konstrukt im Genom integriert ist.

Die Expression eines dominant aktiven Ras2^{G16V} Proteins führt zur Bildung von Filamenten (Lee & Kronstad, 2002). Die Deletion von *ras2* führt dagegen zur einer morphologischen Veränderung der Zelle. Die Zellform wird unregelmäßig, meist kürzer und etwas dicker und verliert ihre sonst konstante, zigarrenförmige Gestalt. Die Deletion von *ras2* führt nicht zu einem Septierungsphänotyp. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Pheromonproduktion und/oder Pheromonperzeption so stark beeinflusst ist, dass die Pathogenität verloren geht. Es konnte in *ras2*-Deletionsmutanten keine *mfa1*-Expression mehr nachgewiesen werden, während es in Anwesenheit von dominant aktivem Ras2 wesentlich stärker exprimiert wird. Die *ras2*^{G16V} Expression führt zu einer Verstärkung der Infektionssymptome (Lee & Kronstad, 2002). In *U. maydis* konnte mit Sql2 ein RasGEF identifiziert werden, der ähnlich wie Ras2^{Q65L}, nach Überexpression Filamente induziert. Dies führte zu der Annahme das Sql2 als Ras2-spezifischer GEF wirkt. Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, dass die Überexpression von konstitutiv aktivem Ras1 keine morphologischen Veränderungen hervorruft. Weiterhin wurde gezeigt, dass Sql2-Deletionsstämme apathogen sind, während eine Überexpression von Sql2 jedoch keinen Effekt auf die pathogene Entwicklung hat.

In *U. maydis* sind vier Proteine bekannt, die RA-Domänen enthalten. Eines davon ist das Bud14-Homolog, das an der Regulation der Morphologie von *U. maydis* beteiligt ist. *Δbud14*-Zellen weisen Defekte in der Knospenbildung, Septierung und Zellmorphologie auf. Die drei weiteren RA-Domänen enthaltenden Proteine sind an der Regulation des Kreuzungssystems in *U. maydis* beteiligt. Eines ist die Adenylatzyklase (Uac1 = *Ustilago* adenylate cyclase), welche den cAMP-Signalweg aktiviert (Gold et al, 1994). Außerdem enthalten die MAPKKK Kpp4 und Ubc2 eine RA-Domäne (*Ustilago* bypass of cyclase 2) (Klosterman et al, 2008; Mayorga & Gold, 1998; Müller, 2003). Bisher konnte noch nicht nachgewiesen werden, welche dieser RA-Domänen enthaltenden Proteine tatsächlich als Ras-Effektoren fungieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der N-Terminus von Ubc2 über eine SAM-Domäne mit Kpp4 interagiert. Die in Ubc2 enthaltene RA-Domäne, erfüllt während des Kreuzungsvorgangs eine entscheidende Aufgabe. Der C-Terminus von Ubc2, welcher zwei SH3-Domänen enthält ist dagegen für die pathogene Entwicklung essentiell, nicht jedoch für den Kreuzungsvorgang (Klosterman et al, 2008; Mayorga & Gold, 2001). Bis heute ist die Frage ungeklärt, welches der beiden Ras-Proteine für diese Effektoren zuständig ist, oder ob die Effektoren möglicherweise sowohl von Ras1 als auch von Ras2 aktiviert werden

können. Durch Überexpression von Ras2^{G16V} induzierte Filamente können sich in Deletionsmutanten der MAPK-Kaskade-Komponenten *fuz7* und *kpp2* nicht bilden. Dies weist darauf hin, dass Ras2 die MAPK-Kaskade reguliert, die am Infektionsprozess beteiligt ist (Lee & Kronstad, 2002). Dagegen ist unklar, welchen Einfluss Ras1 bei der Regulation der MAPK-Kaskade, oder des cAMP-Signalweg hat.

1.4.2 Rac1 in *U. maydis*

Die RhoGTPase Rac1 wurde in *U. maydis* schon näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sie essentiell für das filamentöse Wachstum ist. Während die Überexpression von Rac1 zu filamentösem Wachstum führt, weisen *rac1*-Deletionsmutanten einen Polaritätsverlust auf. Dieser äußert sich durch die depolarisierte Zellform und der veränderten Zelltrennung. $\Delta rac1$ -Zellen bilden keine Knospen aus, die Zelltrennung erfolgt durch Einziehen eines zentralen Septums, ähnlich der Spalthefe (siehe Abbildung 10).

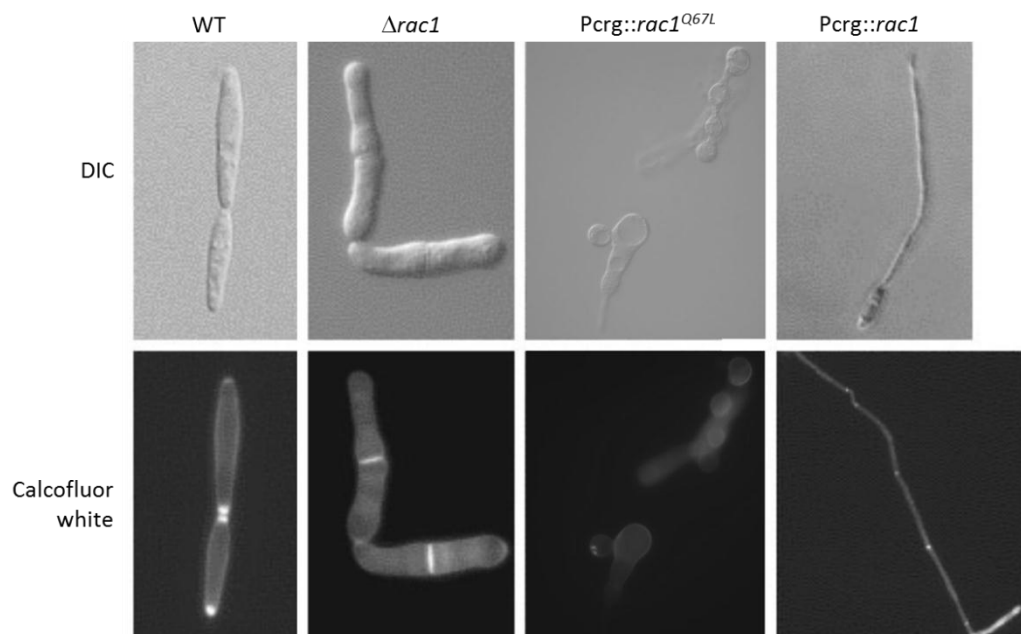


Abbildung 10: Phänotypische Auswirkung von *rac1*-Mutanten in *U. maydis* (Mahlert et al., 2006)

Während *U. maydis* Zellen eine alternierende Knospung an beiden Zellpolen aufweisen, zeigen *rac1*-Deletionsmutanten eine Teilung an einem zentral gebildeten Septum und der Bildung kürzerer und dickerer Zellen. Die Überexpression eines konstitutiv aktiven *rac1*-Allels *rac1*^{Q67L} führt zu einer Vakuolenvergrößerung und zur Lyse der Zellen. Die Überexpression von *rac1* induziert filamentöses Wachstum.

In *rac1*-Deletionsmutanten kann das b induzierte Filament nicht mehr ausgebildet werden, *U. maydis* Zellen ohne Rac1 sind apathogen. Darüber hinaus erfüllt Rac1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Vakuolenmorphologie, da *rac1*-Deletionsmutanten fragmentierte Vakuolen aufweisen und die Überexpression von dominant aktivem Rac1 zur Bildung einer stark vergrößerten Vakuole führt (Mahlert et al, 2006).

In *U. maydis* sind bislang drei potentielle Effektoren von Rac1 bekannt. Smu1, Skm1 und Cla4 gehören alle drei zu der weit verbreiteten Familie der PAKs. Die Rac1-Effektoren von *U. maydis* Smu1 und Cla4 sind homolog zu den Cdc42-Effektoren Ste20 und Cla4 in der *S. cerevisiae* (Ramer & Davis, 1993; Smith et al, 2004). Die Deletion von Smu1 zeigt in *U. maydis* keine auffälligen morphologischen Veränderungen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Smu1 beim Kreuzungsvorgang eine Rolle spielt (Smith et al, 2004). Die Deletion von *cla4* hingegen weist eine sehr ähnliche morphologische Auswirkung wie die einer *rac1*-Deletion auf. Cla4 ist für die Rac1 induzierte Filamentbildung verantwortlich, da eine Überexpression von *rac1* in *cla4*-Deletionsstämmen kein filamentöses Wachstum induzieren kann (Leveleki et al, 2004; Mahlert et al, 2006). Bisher ist jedoch noch unklar über welche Zielproteine die Proteinkinase Cla4 die Morphogenese und Polarität in *U. maydis* steuert. Bei der näheren Untersuchung des Rac1 abhängigen filamentösen Wachstums konnte der GEF Cdc24 identifiziert werden, der in *U. maydis* den Nukleotidaustausch an Rac1 katalysiert. Cdc24 ist jedoch kein spezifischer GEF für Rac1, da auch Cdc42 durch Cdc24 aktiviert werden kann (Schink, 2010). In *U. maydis* ist Cdc24 ein essentielles Protein, das an der Rac1 abhängigen Filamentinduktion beteiligt ist. Es konnte ein Modell erarbeitet werden, welches die molekularen Ereignisse während des filamentösen Wachstums beschreibt. Cdc24 und Cla4 bilden zusammen mit dem Scaffoldprotein Bem1 einen ternären Komplex. Das an Bem1 gebundene Cdc24 besitzt eine hohe Affinität zur Bindung von Rac1GDP, welches an der Zytoplasmamembran lokalisiert ist. Durch die Interaktion von Cdc24 mit Rac1GDP wird der Cdc24/Cla4/Bem1-Komplex an die Membran gebracht und Rac1 in seine GTP-gebundene Konformation überführt. Daraus resultiert ein stabilisierter aktiver ternärer Komplex aus Cdc24/Rac1/Cla4 und Bem1. In diesem Komplex aktiviert Rac1GTP die Kinaseaktivität von Cla4. Interessanterweise konnte nach der Aktivierung von Rac1 durch Cdc24 eine Degradation von Cdc24 nachgewiesen werden. Der Abbau von Cdc24 wird vermutlich durch die direkte Phosphorylierung von Cdc24 durch Cla4 nach dessen Aktivierung

hervorgerufen (siehe Abbildung 11). Sowohl die Identität der phosphorylierten Aminosäuren, als auch deren genauen Herkunft ist jedoch noch unbekannt (Sonja Frieser, unveröffentlichte Daten). Die Begrenzung der lokalen Aktivität von Rac1 wird vermutlich durch GAP-Proteine gewährleistet (S. Frieser, B. Sandrock, unveröffentlichte Daten).

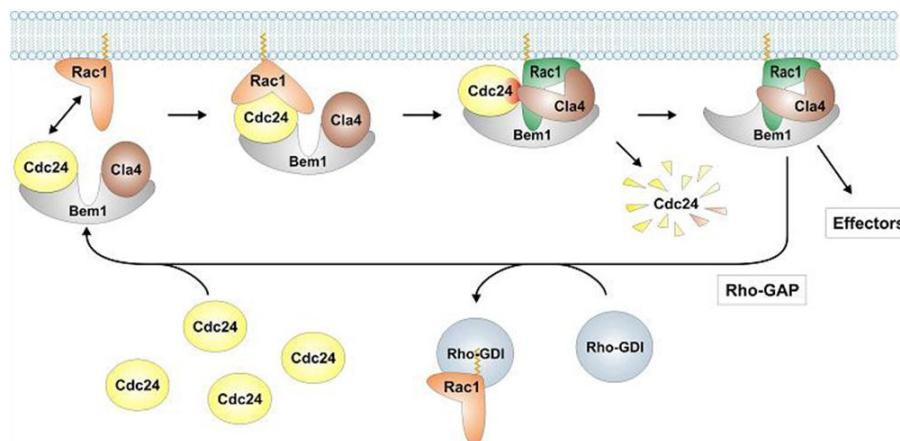


Abbildung 11: Model der Rac1 Aktivierung an der Zellschale (Sonja Frieser, unveröffentlichte Daten)

S. Frieser konnte während ihrer Doktorarbeit ein Model erstellen, welches zeigt, dass Cdc24 an einen Bem1/Cla4 Komplex bindet. Der aus Bem1/Cdc24/Cla4 bestehende Komplex kann dann mit Rac1GDP, welches an der Zytoplasmamembran lokalisiert, interagieren. Daraufhin wird Rac1 von Cdc24 aktiviert. Nach der Aktivierung von Rac1 durch Cdc24 wird Cdc24 degradiert. Das aktive Rac1 kann seinen Effektor Cla4 aktivieren. Die Inaktivierung von Rac1 erfolgt durch RhoGAPs. Durch RhoGDIs kann Rac1 in seinem inaktiven Zustand von der Zytoplasmamembran fern gehalten werden.

1.5 Zielsetzung

Die kleine GTPase Ras1 ist ein essentieller Regulator der Zellmorphologie im phytopathogenen Basidiomyceten *U. maydis*. Für RasGTPasen ist allgemein bekannt, dass sie ganz unterschiedliche Prozesse in der Zelle beeinflussen können. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von Ras1 in *U. maydis* genauer zu charakterisieren. Im Besonderen sollte die Rolle der GTPase während der Bildung von Filamenten untersucht werden. Ein wichtiger Bestandteil sollte die Charakterisierung der Signalwege, die unterhalb des Ras1-Signalwegs wirken, sein (die MAPK-Kaskade, der cAMP-Signalweg und der Rac1-Signalweg). Es sollte außerdem untersucht werden, ob die unterschiedlichen Funktionen von Ras1 voneinander getrennt werden können. Dies

sollte zum einen durch die Analyse verschiedener Ras1 Aktivatoren mit spezifischen Funktionen geschehen. Ein weiterer Ansatz sollte darin bestehen eine besondere *ras1*-Mutation zu erzeugen, die nur noch an bestimmten Orten lokalisieren und wirken kann. Die Charakterisierung von Ras1 abhängigen Signalwegen sollte zum einen mit genetische Methoden *in vivo* erfolgen. Parallel sollte gereinigtes Ras1 *in vitro* analysiert werden.

2 Ergebnisse

Ras-Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Signalweiterleitung und Morphogenese von Eukaryoten. In *U. maydis* war bereits bekannt, dass Ras1 ein essentielles Protein ist, welches an der Regulation der Zellmorphologie, der Vakuolenmorphologie und der Kernverteilung beteiligt ist (Mahlert, 2006). Außerdem führt die Überexpression von Ras1 zu filamentösem Wachstum. Die Expression von dominant aktivem Ras1^{Q67L} ruft eine transkriptionelle Induktion des für das Pheromon codierenden *mfa1*-Gens hervor und aktiviert die MAPK-Kaskade.

2.1 Ras1 ist an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt

In vielen Organismen konnte gezeigt werden, dass kleine GTPasen der Ras-Familie an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind (Li & Bowerman, 2010). Um zu untersuchen, ob das Zytoskelett von *U. maydis* von Ras1 reguliert wird, wurde in den konditionalen Ras1-Stamm sowohl Aktin- (AbpYFP) als auch Mikrotubuli- (Tub1-RFP) Marker eingebracht. In *U. maydis* werden in konditionalen Ras1-Mutanten starke morphologische Auswirkungen beobachtet. Die Zellen verlieren ihre Polarität und ändern ihre Morphologie von länglich wachsenden Zellen zu abgerundeten, apolaren Zellen (Mahlert, 2006). Eine längere Depletion von Ras1 führt zum Absterben der Zellen. Die mikroskopische Analyse zeigte, dass das Aktinzytoskelett nach Depletion von Ras1 sich deutlich von wt-Zellen zu unterscheiden ist (siehe Abbildung 12). Während in wildtypischen Zellen sowohl Aktin-Filamente als auch Aktin-*patches* zu erkennen sind, weisen Zellen mit Ras1-Depletion ausschließlich Aktin-*patches* auf. Auf induzierendem Medium finden sich dagegen Aktin-*patches* über das gesamte Filament verteilt und Aktin-Filamente an der Filamentspitze. Auch die Mikrotubuli, welche in wt-Zellen stets an der Polaritätsachse von *U. maydis* ausgerichtet sind, liegen in Ras1 depletierten Zellen ungeordnet in willkürlicher Orientierung in der Zelle vor. Folglich hat die Depletion von Ras1 einen entscheidenden Einfluss auf die Organisation des Aktin- und Tubulinzytoskeletts in *U. maydis*. Nach Überexpression von Ras1 auf Arabinose-haltigem Medium sind über das gesamte Filament hinweg lange Mikrotubulifilamente zu erkennen.

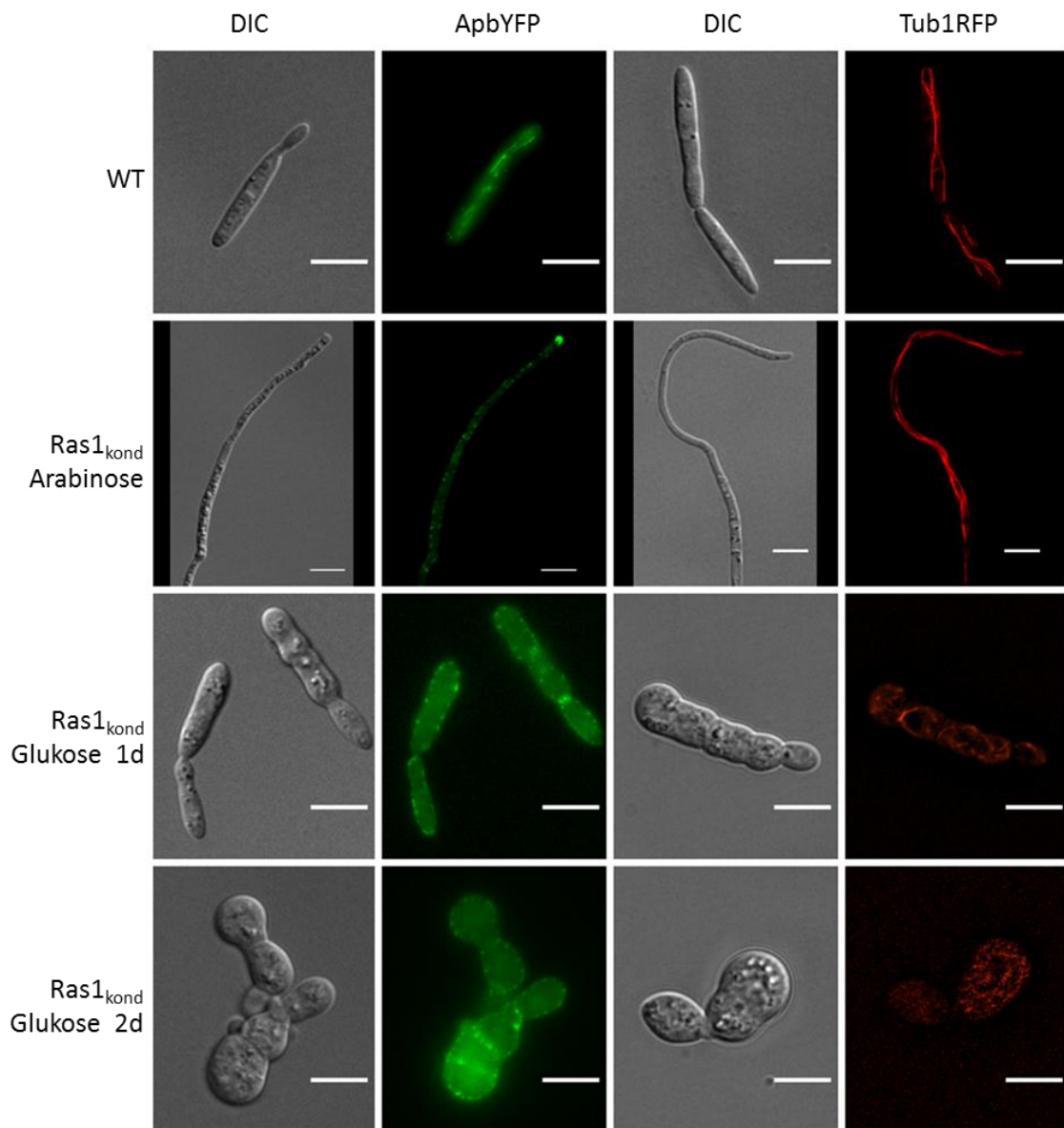


Abbildung 12: Die Organisation des Zytoskeletts ist in dem konditionalen Ras1-Stamm deutlich dereguliert

In wildtypischen Zellen zeigt der Aktinmarker ApbYFP Aktinfilamente, die von der Mutterzelle in die Tochterzelle reichen. Im konditionalen Ras1-Stamm sind auf Arabinose-haltigem Medium Aktinfilamente an der Filamentspitze und über das gesamte Filament verteilte Aktin-*patches* zu erkennen. Nach Depletion von Ras1 sind lediglich Aktin-*patches*, jedoch keine Aktinfilamente zu sehen. Das Mikrotubulizytoskelett, durch Tub1RFP markiert, weist in wildtypischen Zellen eine Organisation der Filamente in der Polaritätsachse auf. Auch Zellen des Ras1_{kond}-Stammes auf induzierendem Medium weisen langgestreckte Mikrotubulifilamente auf. Nach Depletion von Ras1 liegen die Mikrotubulifilamente ungerichtet in der Zelle vor.

2.2 Dominant aktives Ras1^{G18V} induziert die Bildung multipler Septen

Um die zellulären Funktionen kleiner GTPasen zu untersuchen, werden häufig dominant aktive Varianten benutzt, die nicht in ihre inaktive GDP-gebundene Form überführt werden können. Von humanen GTPasen sind zwei Mutationen bekannt, die zu einer solchen dominant aktiven Form führen, dies sind die G12V-Mutation und die Q61L-Mutation. In einer vorangegangenen Arbeit wurde bereits ein *ras1^{Q67L}*-Allel unter der Kontrolle des regulierbaren *crg*-Promotors in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert (Mahlert, 2006). Bei der Integration in den *ip*-Locus durch homologe Rekombination, entstehen häufig Mehrfachintegrationen. Bei der Überexpression des Allels wurde beobachtet, dass die besonders auffällige Auswirkung der *ras1^{Q67L}* Expression, wie die Bildung mehrfach septierter Zellen, ausschließlich nach Mehrfachintegration des *ras1^{Q67L}* Allels nachzuweisen sind. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, aus welchem Grund sich diese zellulären Veränderungen erst nach einer starken Überexpression des dominant aktiven *ras1* Allels einstellen. Hierfür wurde ein weiteres dominant aktives Allel erzeugt, *ras1^{G18V}*. Ras1^{G18V} wurde ebenfalls unter der Kontrolle des *crg*-Promotors, in den *ip*-Locus von *U. maydis* eingebracht. Transformanten wurden mittels eines Southernblots auf das Vorliegen einer einfachen oder mehrfachen Integration des Überexpressionskonstruktes untersucht. Der Southernblot zeigt, dass sowohl Transformanten mit Einzel- als auch solche mit Mehrfachintegrationen des Konstrukts isoliert werden konnten (siehe Abbildung 13 A). Alle Transformanten wurden mikroskopisch untersucht. Die Induktion der Expression von Ras1^{G18V} auf Arabinose-haltigem Medium führt zu mehrfachseptierten Zellen unabhängig von der Kopienzahl des Konstrukts (siehe Abbildung 13 B). Auch weitere mikroskopische Analysen, bei denen die Septen, die Vakuolen oder die Kerne gefärbt wurden, wiesen keine Unterschiede zwischen Zellen auf, die eine Einzel- oder Mehrfachintegration des pCrgras1^{G18V} Konstrukts oder eine Mehrfachintegration von pCrgras1^{Q67L} tragen. Ferner konnte durch Northernblot Analysen gezeigt werden, dass die Expression von ein- oder mehrfach integriertem *ras1^{G18V}* und die Expression von mehrfach integriertem *ras1^{Q67L}* zu einer Repression des Gens *frb34* führten. Nach Expressionsinduktion von einfach integriertem *ras1^{Q67L}* zeigte sich keine Veränderung der *frb34* Transkriptmenge (siehe Abbildung 15). Dies deutet darauf hin, dass das *ras1^{Q67L}*-Allel in *U. maydis* nicht vollständig dominant wirkt und so die zellulären Effekte erst nach sehr starker Überexpression auftreten.

Da die Expression von *ras1*^{G18V} schon bei einer geringeren Expression zur Ausprägung der Septenbildung führt, ist davon auszugehen, dass das *ras1*^{G18V}-Allel stärker wirkt.

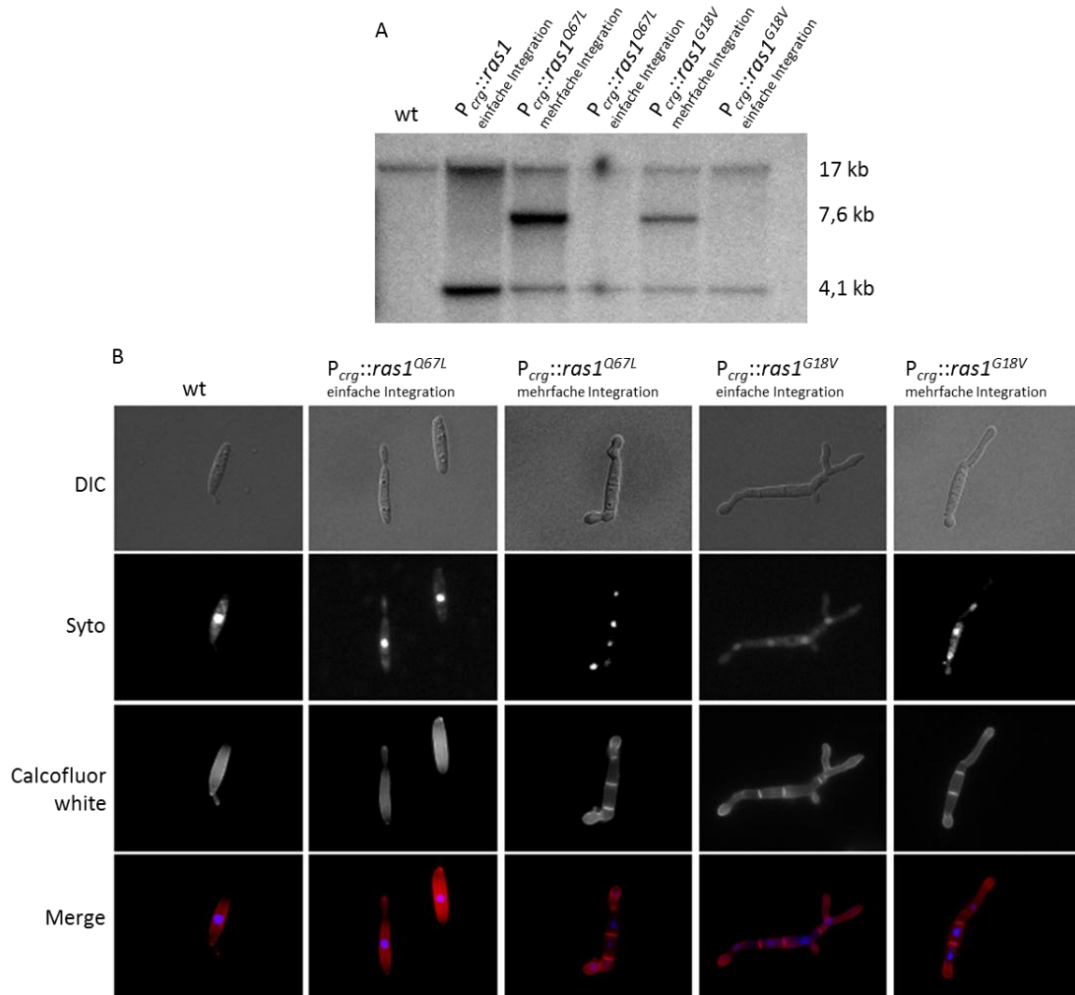


Abbildung 13: Überexpression dominant aktiver *ras1*-Allele

Wie für die Überexpressionsstämme von *ras1*^{Q67L} wurden auch für *ras1*^{G18V} Überexpressionsstämme mit einfacher oder mehrfacher Integration des Konstrukts pRU11-*ras1*^{G18V} generiert. A) Um die Integrationshäufigkeit des Konstrukts zu überprüfen, wurde eine Southern-Analyse durchgeführt. Die genomische DNA der erhaltenen Transformanten wurde mit EcoRV geschnitten, als Sonde wurde der *cbx* ORF verwendet. Bei einer Einfachintegration des Konstrukts ergeben sich im Southern-Blot zwei Banden (17 kb und 4,1 kb). Bei Mehrfachintegration kommt eine dritte, 7,6 kb große Bande hinzu. B) Mikroskopische Analyse der Morphologie der *ras1*^{Q67L} oder *ras1*^{G18V} exprimierenden Stämme nach 8 h Wachstum in Arabinose-haltigem Medium. Während Zellen die eine Einfachintegration des pRU11-*ras1*^{Q67L} Konstrukts enthalten keine morphologische Änderung zeigen, ist bei *ras1*^{G18V} exprimierenden Zellen, unabhängig der Integrationshäufigkeit des Konstrukts, die Ausbildung multipler Septen zu beobachten. Zwischen den Septen ist stets ein Kern vorhanden.

2.3 Ras1 aktiviert den cAMP-Signalweg

Um die Signalnetzwerke, an denen RasGTPasen in *U. maydis* beteiligt sind, besser zu verstehen, wurde die Frage gestellt, welche Effektoren von den RasGTPasen aktiviert werden. Bekannt ist, dass Ras-Effektorinteraktionen meist über eine Interaktion der RasGTPase mit Proteinen die Ras-Assoziationsdomänen (RA-Domänen) enthalten erfolgen. RA-Domänen weisen eine sehr heterogene Konsensussequenz auf, bilden jedoch eine ähnliche räumliche Proteinstruktur aus. Für RA-Domänen ist beschrieben, dass sie sowohl mit Ras- als auch mit RhoGTPasen interagieren können (Truckses et al, 2004). Vorhersagen über die Spezifität der RA-Domäne gegenüber GTPasen lassen sich allein aufgrund der Sequenz nicht treffen. In *U. maydis* werden vier Gene expromiert, die für RA-Domänen enthaltende Proteine kodieren. Dies ist zum einen die Adenylatzyklase Uac1, die auch in *S. cerevisiae* und *Candida albicans* bereits als Ras-Effektor beschrieben ist (Fang & Wang, 2006; Field et al, 1988). Weitere RA-Domäne enthaltende Proteine sind die MAPKKK Kpp4, das MAPKKK interagierende Protein Ubc2 und Bud14, die in folgenden Kapiteln behandelt werden.

2.3.1 Ras1 und Ras2 interagieren mit der Adenylatzyklase Uac1

Die Adenylatzyklase Uac1 stellt aufgrund der in ihrer Proteinsequenz enthaltenen RA-Domäne einen potentiellen Effektor von Ras1 oder Ras2 dar. Aus diesem Grund wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien von Ras1 oder Ras2 mit Uac1 durchgeführt. Hierzu wurde die Adenylatzyklase an ihrem genomischen Locus mit einem HA-Epitop fusioniert. Die beiden GTPasen Ras1 und Ras2 wurden als GST-Fusionsproteine aus *E. coli* aufgereinigt. GST-Ras1, bzw. GST-Ras2 wurden an GSH gekoppelte Agarosebeads gebunden und in einem Pulldown-Experiment eingesetzt. Dazu wurden sie entweder mit GDP oder GTP γ S, das nicht in GDP hydrolysiert werden kann, beladen. Die mit dem jeweiligen Nukleotid beladenen GTPasen wurden mit einem Proteinextrakt aus *U. maydis* inkubiert, in dem das Uac1HA Fusionsprotein enthalten war. Nachdem unspezifische bzw. nicht bindende Proteine durch mehrere Waschschrte entfernt worden waren, wurde der Überstand auf einem SDS-Gel aufgetrennt und Uac1HA durch Westernblot Analyse mit einem anti-HA-Antikörper nachgewiesen. Dieser zeigte, dass Uac1HA gleichermaßen an Ras1GDP, Ras1GTP, Ras2GDP und Ras2GTP bindet. Die Kontrollreaktion in der die GSH-Beads ohne GTPase mit der Adenylatzyklase inkubiert wurde, zeigte keinerlei Interaktion mit Uac1HA (siehe Abbildung 14).

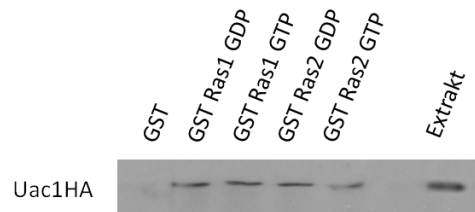


Abbildung 14: Interaktionsnachweis von RasGTPasen mit Uac1

Das Pulldown-Experiment zeigt eine Interaktion zwischen Ras1GDP, Ras1GTP, Ras2GDP und Ras2GTP mit Uac1HA. Es bestehen keine Unterschiede in der Stärke der Interaktion zwischen den getesteten GTPasen und dem gebundenen Nukleotid.

2.3.2 Die Aktivität des cAMP-Signalweges wird durch dominant aktives

Ras1 erhöht

GTPase Effektor Interaktionen sind charakteristischer Weise abhängig vom Beladungszustand der GTPase. Da eine Interaktion zwischen Uac1 und den GTPasen unabhängig des Beladungszustandes gezeigt wurde, stellte sich die Frage, ob Ras1 den cAMP-Signalweg auch aktiviert und die Proteininteraktion auch physiologisch relevant ist. Hierfür wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Als Reporter für einen aktivierten cAMP-Signalweg diente die Expression des Gens *frb34*, die durch eine aktive Proteinkinase A (Adr1) induziert wird (Brachmann et al, 2001). Eine weitere Signalkaskade, die als Antwort auf Pheromonstimulation aktiviert wird, ist die MAPK-Kaskade, die reprimierend auf die *frb34* Expression wirkt. Um *frb34* als Reporter für die Aktivität des cAMP-Signalweges nutzen zu können, wurde ein Stamm verwendet, in dem die MAPKKK (Kpp4) deletiert ist. In einem *kpp4*-Deletionsstamm bleibt die Expression von *frb34* unverändert (nicht gezeigt). Dies erlaubt es die Regulation des cAMP-Signalweges isoliert von der Pheromonantwort zu betrachten. Um eine Ras abhängige Aktivierung des cAMP-Signalweges zu untersuchen, wurde das dominant aktive *ras1^{G18V}*-Allel in einem *kpp4*-Deletionsstamm exprimiert und die Expression von *frb34* untersucht. Auf dem Northernblot ist zu erkennen, dass die Expression von *frb34* nach der Induktion von *ras1^{G18V}* deutlich ansteigt (siehe Abbildung 15). Dies deutet darauf hin, dass aktives Ras1 den cAMP-Signalweg aktivieren kann.

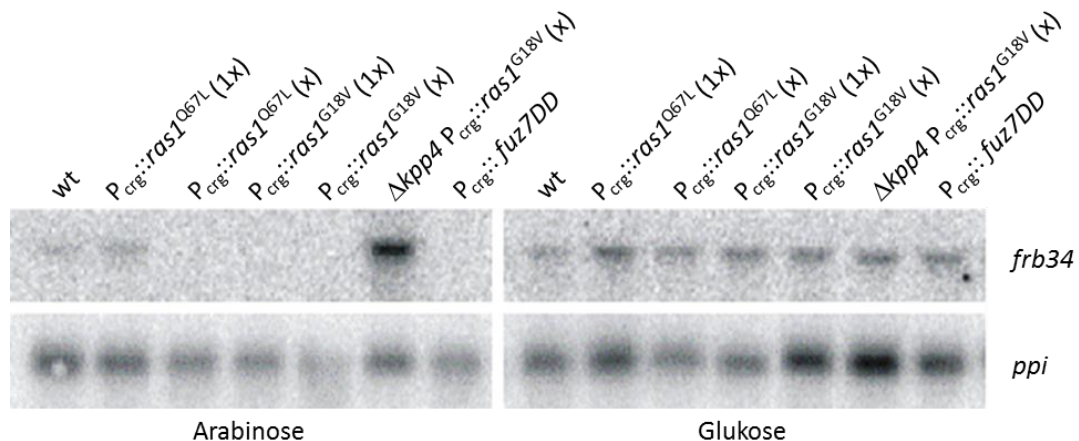


Abbildung 15: Expressionsanalyse des Reportergens *frb34*

Dargestellt ist die Expressionsanalyse von *frb34* nach 6-stündiger Induktion der Expression der dominant aktiven *ras1*-Allele bei einfacher oder mehrfacher Integration der entsprechenden Vektoren (1x= Einfachintegration, x= Mehrfachintegration). Während *ras1*^{Q67L} bei einfacher Integration keinen Einfluss auf die *frb* Expression ausübt, wirkt die Überexpression von *ras1*^{Q67L} (x), *ras1*^{G18V} (1x), *ras1*^{G18V} (x) und *fuz7DD* reprimierend auf die Expression von *frb34*. Dies ist ein Nachweis dafür, dass die MAPK-Kaskade aktiviert wird. Durch die Überexpression von *ras1*^{G18V} in einem Δ*kpp4*-Stamm wird die Expression von *frb34* deutlich induziert, was ein Nachweis der Aktivierung des cAMP-Signalwegs darstellt.

2.4 Die MAPK-Kaskade als potentielles Ziel der Ras-Aktivität

Die MAPKKK Kpp4 ist bereits als Ras2 Effektor beschrieben, da eine Überexpression von dominant aktivem *ras2*^{G16V} in *kpp4*- und *fuz7*-Deletionsstämmen nicht zu filamentösem Wachstum führt (Lee & Kronstad, 2002). Ob Kpp4 ebenfalls ein Effektor von Ras1 darstellt, ist bisher unbekannt. Es wurde jedoch in einer vorangegangenen Doktorarbeit bereits postuliert, dass Ras1 den cAMP-Signalweg, nicht jedoch die MAPK-Kaskade aktiviert (Müller, 2003). Die Experimente dieser Arbeit wurden jedoch mit einem inkorrekten Ras1-Klon durchgeführt, welches neben der Q67L-Mutation noch eine 100 bp große Insertion enthält, die die Funktionen von Ras1 stört (Mahlert, 2006). Die Expression von *ras1*^{Q67L} ohne die störende Insertion führt nach starker Überexpression, die durch mehrfache Integration des Allels in das Genom von *U. maydis* erzeugt wurde, zu einem Multiseptierungsphänotyp. Des Weiteren wird in diesem Stamm Ras1^{Q67L}-abhängig die Expression von *frb34* reprimiert und die von *mfa1* induziert. Diese Versuche deuten darauf hin, dass Ras1 die MAPK-Kaskade aktivieren kann (Mahlert, 2006).

2.4.1 Die Aktivität der Pheromon induzierten MAPK-Kaskade wird durch Überexpression von *ras1*^{G18V} erhöht

Um zu untersuchen, ob Ras1 die MAPK-Kaskade aktivieren kann, wurden Expressionsanalysen von MAPK-Kaskade regulierten Genen durchgeführt. Diese Versuche zeigen, dass die Expression von *ras1*^{G18V} die Expression von *frb34* reprimiert. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass neben Ras2 auch Ras1 die MAPK-Kaskade aktivieren kann (siehe Abbildung 15). Eine Aktivierung der MAPK-Kaskade durch Expression von Fuz7DD, einer aktiven Variante der MAPKK Fuz7, führt zu filamentösem Wachstum und zu einem Zellzyklusarrest. Diese Effekte unterscheiden sich deutlich von den durch die Überexpression von *ras1*^{G18V} induzierten morphologischen Veränderungen. Zum einen induziert die Überexpression von *ras1*^{G18V} kein filamentöses Wachstum und zum anderen wird der Zellzyklus der *ras1*^{G18V} exprimierenden Zellen nicht arretiert. Es ist daher bemerkenswert, dass die Aktivierung der MAPK-Kaskade durch die Expression von *ras1*^{G18V} andere zelluläre Auswirkungen zeigt als durch die Überexpression einer dominant aktiven MAPKK. Darüber hinaus ist es bemerkenswert, dass nach Expression von wt Ras1, trotz einer Induktion von Filamenten, keine Aktivierung der MAPK-Kaskade nachzuweisen ist. Dies deutet darauf hin, dass die von Ras1 induzierte Filamentbildung nicht über die MAPK-Kaskade vermittelt wird.

2.4.2 Ras1 interagiert mit Kpp4

Da eine Aktivierung der MAPK-Kaskade durch dominant aktives Ras1 gezeigt werden konnte wurde nun auch untersucht, mit welcher Komponente der MAPK-Kaskade Ras1 interagieren kann. Einen potentiellen Interaktionspartner von Ras1 stellt die MAPKKK Kpp4 dar, da deren Proteinsequenz eine RA-Domäne beinhaltet. Um Ras1 und Kpp4 auf Protein-Protein-Interaktion zu untersuchen, wurden, wie schon unter 2.3.1 für die Adenylatzyklase, Präzipitationsexperimente durchgeführt. Diese zeigten, dass Ras1 in seiner GTP-gebundenen Form mit Kpp4 interagiert (siehe Abbildung 16). Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung der MAPK-Kaskade durch *ras1*^{G18V} durch eine Interaktion zwischen aktivem Ras1 und Kpp4 vermittelt werden könnte.

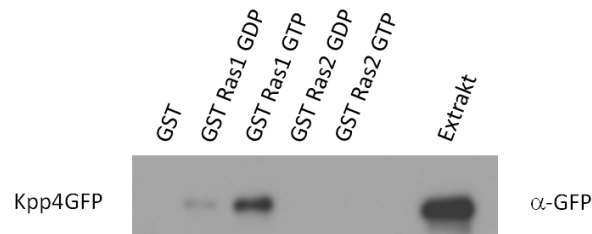


Abbildung 16: Interaktionsnachweis von Ras1GTP mit Kpp4

Um eine Interaktion zwischen Kpp4 und Ras1 oder Ras2 nachzuweisen, wurde ein Präzipitationsexperiment durchgeführt. Zu erkennen ist, dass Kpp4 vorwiegend mit Ras1 in seiner GTP-gebundenen Konformation präzipitiert. Eine Interaktion zwischen Kpp4 und Ras2 konnte in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden.

2.5 Ras1 aktiviert das Bem1/Cdc24/Rac1/Cla4-Signalmodul

Expressionsanalysen und Interaktionsstudien deuten auf eine Aktivierung der MAPK-Kaskade und des cAMP-Signalwegs durch Ras1 hin. Offen bleibt jedoch die Frage, über welchen Signalweg Ras1 das filamentöse Wachstum reguliert. In *U. maydis* konnte ein Signalmodul charakterisiert werden, dass essentiell für filamentöses Wachstum ist. Dieses Signalmodul besteht aus der RhoGTPase Rac1, dem RhoGEF Cdc24, der Kinase Cla4 und dem Gerüstprotein Bem1 (Hlubek et al, 2008; Mahlert et al, 2006) (S. Frieser, unveröffentlichte Ergebnisse). Die für dieses Signalmodul beschriebenen Funktionen während des filamentösen Wachstums legen die Vermutung nahe, dass Ras1 eine Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalwegs bewirken könnte.

2.5.1 Überexpression von Ras1 führt zur Aktivierung des Signalmoduls

Eine Möglichkeit, die Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmoduls nachzuweisen, besteht darin, die Stabilität des Cdc24-Proteins zu untersuchen, da die Aktivierung des Signalmoduls im Abbau des Cdc24-Proteins resultiert. Kommt es aufgrund einer Mutation nicht zu einer Aktivierung des Signalmoduls, beispielsweise durch Deletion einer der beteiligten Komponenten, bleibt Cdc24 stabil (siehe Abbildung 17 A) (S. Frieser, unveröffentlichte Daten). Um die Aktivierung des Signalmoduls zu untersuchen, wurde in einer von mir betreuten Bachelorarbeit von Annemarie Heskamp die Stabilität von Cdc24GFP nach Überexpression von *ras1* und *ras1^{G18V}* analysiert. Zum Nachweis von Cdc24 wurde ein Stamm verwendet, der

konstitutiv ein Cdc24GFP-Fusionsprotein exprimiert. Nach Überexpression von *ras1* als auch von *ras1^{G18V}* wurden deutlich reduzierte Cdc24GFP-Mengen detektiert (siehe Abbildung 17 B). Die Ergebnisse dieses Versuchs weisen darauf hin, dass Ras1 das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul aktiviert. S. Frieser konnte nachweisen, dass das Cdc24GFP-Protein in deutlich höherer Konzentration in der Zelle vorliegt, wenn die GTPase Rac1 abwesend ist. Die Stabilität des Cdc24GFP-Proteins nach Überexpression von *ras1* in einem *rac1*-Deletionshintergrund ist zwar deutlich stabiler als in der Anwesenheit von Rac1, jedoch ist eine Reduktion der Cdc24GFP-Proteinmenge zu detektieren.

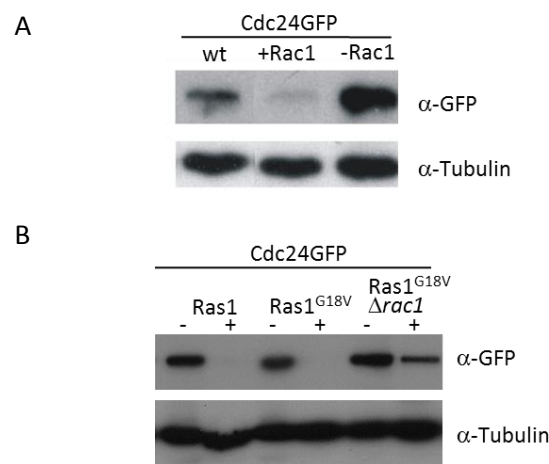


Abbildung 17: Untersuchung der Cdc24GFP Stabilität nach Überexpression von *ras1* und *ras1^{G18V}*

A) Cdc24GFP wird durch Überexpression von *rac1* degradiert während die Abwesenheit von Rac1 stabilisierend auf das Cdc24GFP Proteinlevel wirkt ((A) S. Frieser, unveröffentlichte Daten). Die Überexpression von *ras1*, *ras1^{G18V}* unter der Kontrolle des *crg*-Promotors führen zur Degradation von Cdc24GFP. Der destabilisierende Effekt auf Cdc24GFP nach Überexpression von *ras1^{G18V}* kann durch Deletion von *rac1* deutlich reduziert werden (B). Die Induktion der *rac1*, bzw. *ras1*-Allele erfolgte für 6 Stunden auf induzierendem Medium.

2.5.2 Dominant aktives Ras1 beeinflusst die Lokalisation von Cdc24

Neben dem Abbau von Cdc24 nach Expression von *ras1^{G18V}* wurde auch die Lokalisation von Cdc24GFP untersucht. In wildtypischen Zellen lokalisiert Cdc24GFP an dem wachsenden Zellpol (S. Frieser, unveröffentlichte Daten). Nach Überexpression von *ras1^{G18V}* lokalisiert Cdc24GFP nicht mehr ausschließlich am wachsenden Pol der Zellen, sondern an der gesamten Zytoplasmamembran und an Septen (siehe Abbildung 18). Dies deutet darauf hin, dass aktives Ras1 Cdc24 rekrutieren kann.

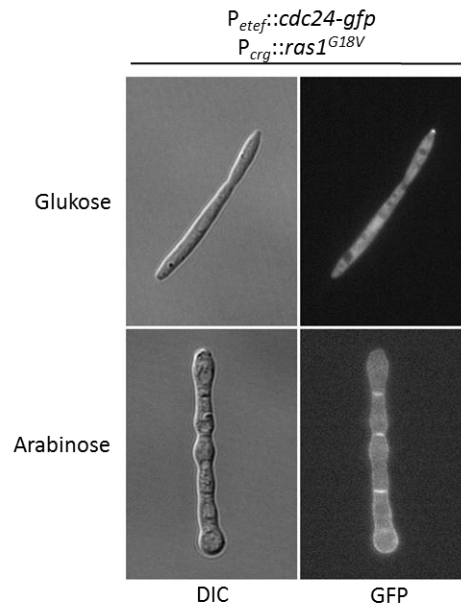


Abbildung 18: Lokalisation von Cdc24GFP nach Überexpression von $ras1^{G18V}$

Cdc24GFP lokalisiert am wachsenden Zellpol. Die Induktion der $ras1^{G18V}$ Expression über 6 Stunden auf Arabinose-haltigem Medium führt zur Lokalisation von Cdc24GFP an der gesamten Zytoplasmamembran und an Septen.

2.5.3 Ras1 und Cdc24 interagieren vermutlich nicht direkt

Eine Möglichkeit, die Ras1 abhängige Rekrutierung von Cdc24 zu erklären, ist eine direkte Interaktion zwischen Ras1 und Cdc24. Um diese potentielle Interaktion zu überprüfen, wurden Interaktionsstudien von Ras1 und Cdc24 durchgeführt. Hierzu wurde *U. maydis* Proteinextrakt aus einem Cdc24GFP exprimierenden Stamm mit *rac1*-Deletion zu mit Ras1GDP und Ras1GTP beladenen GSH-Agarosebeads gegeben. Der Proteinextrakt wurde aus einem $\Delta rac1$ -Stamm gewonnen, da in diesem Stamm Cdc24GFP nicht abgebaut wird und somit eine höhere Cdc24GFP Proteinkonzentration im Proteinextrakt vorliegt. In diesen Präzipitationsexperimenten konnte keine Interaktion zwischen Ras1 und Cdc24GFP nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19). Um zu untersuchen, ob eine indirekte Interaktion besteht, wurde das Präzipitationsexperiment mit endogen fusioniertem Cdc24HA durchgeführt. Für die endogene Fusion wurde ein HA-Tag gewählt, da sich dieser mit dem vorhandenen Antikörper in geringeren Konzentrationen nachweisen lässt als ein GFP-Tag. Ein *U. maydis* Stamm, der die Cdc24HA Fusion am endogenen Locus trägt, war bereits von

S. Frieser erstellt worden. In diesem Präzipitationsexperiment konnte sowohl eine Interaktion zwischen Ras1GDP als auch von Ras1GTP mit Cdc24HA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19). Diese Experimente deuten darauf hin, dass Ras1 unabhängig seines Beladungszustandes mit Cdc24 interagiert.

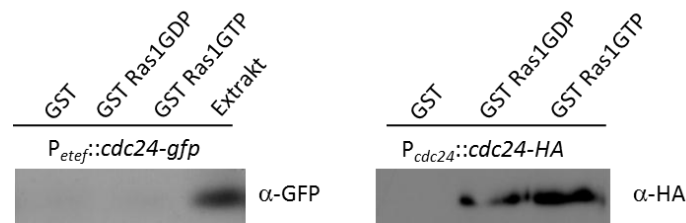


Abbildung 19: Interaktionsnachweis zwischen Ras1 und Cdc24

In einem Präzipitationsexperiment konnte eine Interaktion zwischen Ras1GDP und Ras1GTP mit endogen fusioniertem Cdc24HA nachgewiesen werden. In einem Präzipitationsexperiment mit überexprimiertem Cdc24GFP aus einem $\Delta rac1$ -Stamm war keine Interaktion zu detektieren.

2.6 Die Filamentinduktion von Ras1 und Rac1 benötigt das Vorhandensein der MAPK-Kaskade

Unter 2.4.1 und 2.4.2 wurde gezeigt, dass GTP-gebundenes Ras1 mit Kpp4 interagiert und dominant aktives Ras1 die MAPK-Kaskade aktiviert. Darüber hinaus wurde unter 2.5.1 gezeigt, dass Ras1 das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul aktiviert. Es stellt sich die Frage, ob auch die MAPK-Kaskade während des Ras1 induzierten filamentösen Wachstums eine Rolle spielt, oder ob die Ras1 vermittelte Filamentbildung ausschließlich über die Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmoduls verläuft. Um dieser Frage nachzugehen, wurde *ras1* in *kpp4*- oder *fuz7*-Deletionsmutanten exprimiert. Diese $\Delta kpp4$ -Mutanten oder $\Delta fuz7$ -Mutanten waren nicht mehr in der Lage, nach der Induktion von *ras1*, Filamente auszubilden (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Proteine der MAPK-Kaskade vorhanden sein müssen, um das Ras1 abhängige filamentöse Wachstum induzieren zu können.

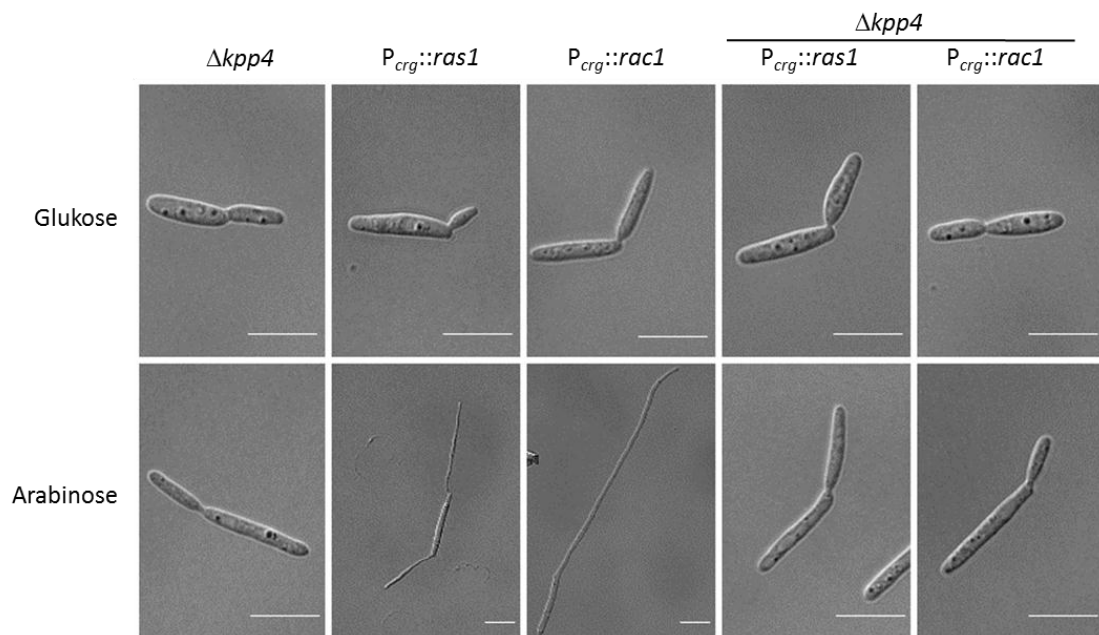


Abbildung 20: Kpp4 ist essentiell für die Filamentbildung nach Überexpression von *ras1* oder *rac1*

Die Überexpression sowohl von Ras1 als auch von Rac1 unter der Kontrolle des *crg*-Promotors induziert auf Arabinose-haltigem Medium filamentöses Wachstum. In einem *kpp4*-Deletionsstamm führt weder die Überexpression von Ras1 noch von Rac1 zur Ausbildung von Filamenten.

Die MAPK-Kaskade ist für das Ras1 induzierte filamentöse Wachstum essentiell. Ob dies auch für das von Rac1 induzierte Filament gilt, wurde ebenfalls näher untersucht. *rac1* wurde unter Kontrolle des *crg*-Promotors in einer *kpp4*-Deletionsmutante exprimiert. Die Transformanten wurden auf Filamentbildung nach Rac1 Überexpression untersucht. Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, führt die Induktion der *rac1* Expression in $\Delta kpp4$ -Stämmen nicht zu filamentösem Wachstum. In *kpp4*-Deletionsstämmen konnte demnach weder nach Induktion von Ras1 noch von Rac1 Filamentbildung beobachtet werden. Das gleiche zeigte sich auch in *fuz7*-Deletionsmutanten. Auch hier führte die Überexpression von Rac1 oder Ras1 nicht zur Induktion des filamentösen Wachstums (siehe Abbildung 21). Dies bedeutet, dass eine funktionelle MAPK-Kaskade die Voraussetzung für die Ausbildung von Filamenten sowohl für den Ras1-Signalweg als auch für den Rac1-Signalweg darstellt. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Proteine der MAPK-Kaskade den Ras1 und Rac1 Signalweg vernetzen.

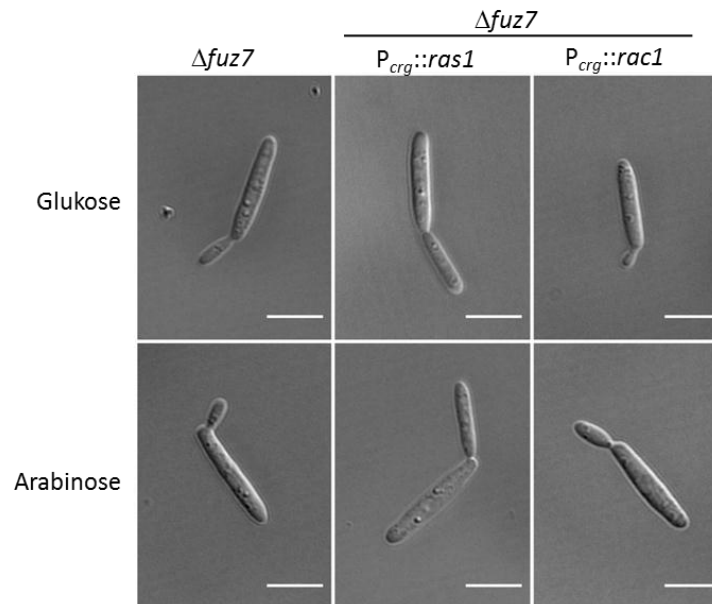


Abbildung 21: Die Überexpression von *ras1* oder *rac1* induziert in $\Delta fuz7$ -Zellen kein filamentöses Wachstum

Zellen der $\Delta fuz7$, $\Delta fuz7$ - $P_{crg}::ras1$ und $\Delta fuz7$ - $P_{crg}::rac1$ -Stämme wurden auf reprimierendem Medium angezogen. Danach wurde die Expression von *ras1* und *rac1* 12 Stunden in Arabinose-haltigem Medium induziert. Weder die Induktion von *ras1* noch von *rac1* induziert in Zellen, die eine *fuz7*-Deletion enthalten, die Ausbildung von Filamenten.

2.7 Die MAPK-Kaskade verknüpft den Ras1-Signalweg mit dem Rac1-Signalweg

Die unter 2.4. dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die MAPK-Kaskade für die Filamentbildung abhängig von Ras1 bzw. Rac1 ist und dass Cdc24 Ras1^{G18V}-abhängig lokalisiert. Es wurde jedoch bisher noch von keiner Verknüpfung zwischen dem Rac1-Signalmodul und der MAPK-Kaskade in *U. maydis* berichtet.

2.7.1 Das RA-Domänenprotein Ubc2 interagiert mit den RhoGTPasen Rac1 und Cdc42

Da das Ste50 Homolog in *U. maydis*, Ubc2, ebenfalls eine RA-Domäne enthält, stellt dieses Adapterprotein eine mögliche Verbindungsstelle der MAPK-Kaskade mit weiteren GTPasen dar. Um zu untersuchen, mit welchen GTPasen Ubc2 interagieren

kann, wurden Präzipitationsexperimente durchgeführt. Die GTPasen Ras1, Ras2, Rac1 und Cdc42 wurden als GST-Fusionsproteine aus *E. coli* aufgereinigt. Die GTPasen wurden entweder mit GDP oder GTP γ S beladen und mit einem Proteinextrakt inkubiert, in dem Ubc2GFP überexprimiert worden war. Der Präzipitationsversuch zeigt, dass Ubc2GFP sowohl mit Rac1 als auch Cdc42 unabhängig ihres Beladungszustands interagiert. Dagegen zeigten weder Ras1 noch Ras2 eine Interaktion mit Ubc2 (siehe Abbildung 22).

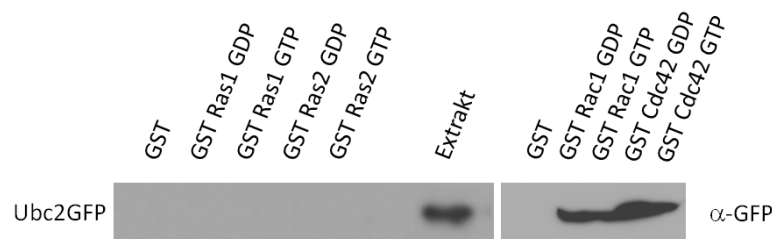


Abbildung 22: Ubc2 interagiert mit Rac1 und mit Cdc42

Um eine Interaktion zwischen Ubc2 und Ras1, Ras2, Rac1 oder Cdc42 nachzuweisen, wurde ein Immuno-Präzipitationsexperiment durchgeführt. Zu erkennen ist, dass Ubc2 sowohl mit Rac1 als auch mit Cdc42 präzipitiert. Eine Interaktion zwischen Ubc2 und Ras1 oder Ras2 konnte nicht nachgewiesen werden.

2.7.2 Cdc24 wird in Abwesenheit von Ubc2 nicht mehr abhängig von Ras1^{G18V} an die Membran lokalisiert

Da Ubc2GFP mit Rac1 und Cdc42 interagiert, nicht jedoch mit Ras1 oder Ras2, wurde untersucht, ob die Interaktion von Ubc2 mit den Rho-GTPasen die Verbindung zwischen dem Ras1- und dem Rac1-Signalweg darstellt. Hierfür wurde die Lokalisation des Cdc24GFP-Proteins in einem Δ ubc2-Stamm untersucht, der Ras1^{G18V} unter der Kontrolle des *crg*-Promotors exprimiert. Auffallend bei diesem Stamm war, dass sich der Multiseptierungsphänotyp nach Induktion der *ras1*^{G18V}-Expression nicht ausprägt. Auch konnte in diesem Stamm keine Ras1^{G18V} abhängige Lokalisation von Cdc24GFP an die Zytoplasmamembran beobachtet werden (siehe Abbildung 23). Dies deutet darauf hin, dass Ubc2 ein Bindeglied zwischen dem Ras1- und Rac1-Signalweg darstellt.

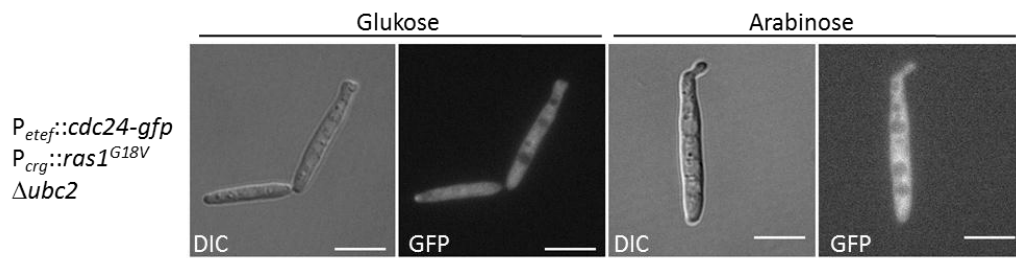


Abbildung 23: Ras1^{G18V} rekrutiert Cdc24GFP in $\Delta ubc2$ -Stämmen nicht an die Zytoplasmamembran

Die Expression von *ras1^{G18V}* wurde 6 Stunden in Arabinose-haltigem Medium induziert. Die Überexpression von *ras1^{G18V}* führt in Abwesenheit von *ubc2* nicht mehr zu einer Lokalisation von Cdc24GFP an der Zytoplasmamembran und an Septen.

2.8 Die intrazelluläre Lokalisation der RasGTPasen wird durch eine Modifikation ihrer C-terminalen Bereiche bestimmt

Für die beobachtete Ras1 abhängige Rekrutierung von Cdc24 an die Zytoplasmamembran und an Septen und die Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmoduls ist eine Lokalisation von Ras1 an der Zytoplasmamembran nötig. Für bestimmte Ras-Proteine wurde jedoch beobachtet, dass sie an Endomembranen lokalisieren können. In humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass die Isoformen H-Ras und N-Ras zusätzlich zur C-terminalen Farnesylierung noch eine weitere posttranslationale Modifikation benötigen um an die Zytoplasmamembran zu binden. Bei dieser Modifikation handelt es sich um eine Palmitoylierung zweier Cysteine im Falle von H-Ras bzw. eines Cysteins bei N-Ras. Die Palmitoylierungsstellen liegen jeweils nur wenige Aminosäuren vor der CAAX-Box (Hancock et al, 1990). Auch in dem humanpathogenen pilzlichen Modellorganismus *C. neoformans* konnte eine Palmitoylierung zweier C-terminaler Cysteine des H-Ras Homologs Ras1 nachgewiesen werden (Nichols et al, 2009). Die Palmitoylierung erfolgt am Golgi-Apparat und ist reversibel. Durch diese posttranslationale Modifikation wird die Lokalisation der RasGTPasen innerhalb der Zelle entscheidend beeinflusst.

2.8.1 Die Ras1-Proteinsequenz beinhaltet ein C-terminales

Palmitoylierungssignal

Um zu untersuchen, ob auch Ras1 und Ras2 in *U. maydis* an unterschiedlichen Membransystemen lokalisieren, wurden deren Proteinsequenzen auf Signale für posttranslationale Modifikationen untersucht. Die beiden Ras-Homologe Ras1 und Ras2 weisen voneinander abweichende Proteinsequenzen in ihrem C-Terminus auf. Um diese Sequenzbereiche näher zu untersuchen, wurde ein Alignment von Ras1 und Ras2 mit den humanen Proteinen H-Ras, N-Ras und K-Ras und Ras1 aus *C. neoformans* erstellt (siehe Abbildung 24). Aus diesem Alignment geht hervor, dass der C-Terminus von Ras1 aus *U. maydis* ähnlich wie die C-Termini von H-Ras und N-Ras und Ras1 in *C. neoformans* Cysteine enthalten, die als Palmitoylierungssignal dienen. Ras2 aus *U. maydis* weist jedoch in seinem C-Terminus Homologien zu dem humanen K-Ras-Protein auf. In dieser Sequenz sind mehrere Lysine enthalten, die eine polybasische Region bilden. Diese erlaubt, nach der Modifikation der CAAX-Box, eine effiziente Lokalisation an der Zytoplasmamembran, ohne dass es einer weiteren Modifikation bedarf (Nichols et al, 2009).

H-Ras (<i>H. s</i>)	HKLRKLNPPDESGPGMSKCVLS
N-Ras (<i>H. s</i>)	YRMKKLNSSDDGTQGMGLPCVVM
Ras1 (<i>C. n</i>)	AVGGRAAEKDDHVDKGCCRGCVVL
Ras1 (<i>U. m</i>)	AGMERFQTEEGSHSAGCCQKCIVL
K-Ras (<i>H. s</i>)	KHKEKMSKDGGKKKKKSKTKCVIM
Ras2 (<i>C. n</i>)	KQGGVAVQAERVGGRRKKKQKCVVL
Ras2 (<i>U. m</i>)	MIREQREGTVTHKKKKSKCNIL

■ = Palmitoylierungsstelle
■ = Polybasischeregion
■ = CAAX-Box

Abbildung 24: Alignment der C-terminalen Aminosäuren von RasGTPasen

Dargestellt ist ein Alignment der 24 C-terminalen Aminosäuren von RasGTPasen. Diese beinhalten eine hypervariable Region, welche ausschlaggebend für die intrazelluläre Lokalisation der Ras-Proteine ist. Während sowohl die humanen Ras-Isoformen H-Ras und N-Ras als auch Ras1 aus *C. neoformans* und *U. maydis* Palmitoylierungsstellen enthalten, weisen die Sequenzen des humanen K-Ras und der Ras2 Proteine aus *C. neoformans* und *U. maydis* eine polybasische Region auf. Darüber hinaus ist eine C-terminale CAAX-Box bei allen GTPasen charakteristisch.

2.8.2 Eine Punktmutation im Palmitoylierungssignal führt zur Lokalisation von Ras1 an Endomembranen

Da die C-terminale Sequenz von Ras1 ein potentielles Palmitoylierungssignal aufweist, wurde untersucht, ob diese Sequenz einen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation der GTPase ausübt. Hierfür wurde ein Ras1-Allel hergestellt, bei dem die beiden Cysteine durch Serine ersetzt sind. Dieses *ras1^{CC207/208SS}*-Allel (*ras1^{CCSS}*) wurde N-terminal mit GFP fusioniert und die Auswirkungen der Mutation auf die Lokalisation von Ras1 in *U. maydis* Zellen untersucht. Die Überexpression von *gfp-ras1^{CCSS}* unter der Kontrolle des *crg*-Promotors führte im Vergleich zur *gfp-ras1* Überexpression nicht zu filamentösem Wachstum. Darüber hinaus konnte keine Lokalisation von *gfp-ras1^{CCSS}* an der Zytoplasmamembran beobachtet werden. GFPRas1^{CCSS} lokalisiert deutlich an Endomembranen (siehe Abbildung 25). Dies deutet darauf hin, dass das C-terminale Palmitoylierungssignal für die stabile Assoziation von Ras1 mit der Zytoplasmamembran verantwortlich ist.

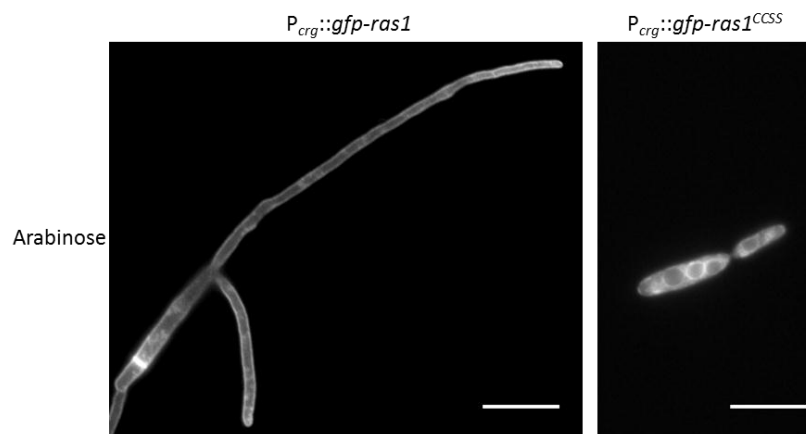


Abbildung 25: Die C-terminale Palmitoylierungssequenz ist für die Lokalisation von Ras1 an der Zytoplasmamembran notwendig

Die Expression von *gfp-ras1* und *gfp-ras1^{CCSS}* wurde 12 Stunden in Arabinose-haltigem Medium induziert. Die Expression von *gfp-ras1* induziert filamentöses Wachstum. GFPRas1 lokalisiert an der Zytoplasmamembran und in Punkten innerhalb der Zelle. GFPRas1^{CCSS} induziert keine Filamentbildung und lokalisiert an Endomembranen, nicht jedoch an der Zytoplasmamembran.

2.9 Für die essentielle Funktion von Ras1 ist keine Lokalisierung an der Zytoplasmamembran erforderlich

Da sich *gfp-ras1^{CCSS}* innerhalb der Zelle an Endomembranen befindet, wurde untersucht, welche der von Ras1 regulierten zellulären Prozesse von an Endomembranen und welche von an der Zytoplasmamembran lokalisiertem Ras1 gesteuert werden.

2.9.1 Die Überexpression von Ras1^{CCSS} supprimiert den letalen Phänotyp der Ras1-Depletion

Um die Funktionen, die Ras1 an Endomembranen erfüllt, zu untersuchen, wurden GFPRas1^{CCSS} und GFPRas1 konstitutiv in dem konditionalen Ras1-Stamm exprimiert. In Arabinose-haltigem Medium bildeten sich wie gewohnt Filamente aus, die aus der Überexpression mit dem *crg*-Promoter resultieren. Wurde die Expression des endogenen *ras1* Gens mit Glukose reprimiert, wurde der extreme Polaritätsverlust des Ras1_{kond}-Stammes durch die Expression von GFPRas1^{CCSS} komplementiert, während in Anwesenheit von konstitutiv exprimiertem wildtypischen Ras1 Filamente zu beobachten waren. Überexprimiertes GFPRas1^{CCSS} führt zu einer nahezu wildtypischen Zellmorphologie (siehe Abbildung 26). Der Tropftest zeigt, dass der konditionale Ras1-Stamm auf reprimierendem Medium kein Wachstum aufweist, während die zusätzliche Expression von Ras1^{CCSS} zu kontinuierlichem Wachstum führt und den letalen Phänotyp der konditionalen *ras1* Mutante aufhebt (siehe Abbildung 27). Dies deutet darauf hin, dass die Palmitoylierung von Ras1 nicht für die essentiellen Funktionen des Proteins notwendig ist.

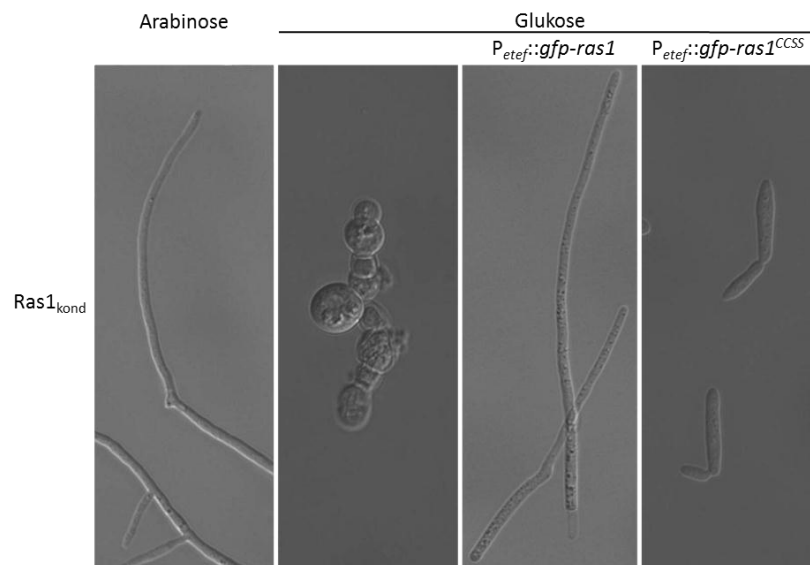


Abbildung 26: Die Überexpression von *ras1^{CCSS}* supprimiert die Depletion von Ras1

Zellen des Ras1_{kond}, Ras1_{kond}-P_{etej}::*gfp-ras1* und Ras1_{kond}-P_{etej}::*gfp-ras1^{CCSS}*-Stammes wurden auf Arabinose-haltigem Medium angezogen. Um zu untersuchen ob die Überexpression von *gfp-ras1* oder *gfp-ras1^{CCSS}* die letale Auswirkung der *ras1*-Depletion komplementieren kann, wurden die Zellen für 2 Tage auf reprimierendem Medium gezogen. Sowohl die Überexpression von *gfp-ras1* als auch von *gfp-ras1^{CCSS}* konnte den Ras1_{kond}-Stamm auf Glukose-haltigem Medium komplementieren.

2.9.2 Die Palmitoylierungsstelle von Ras1 ist in *U. maydis* nicht essentiell

Da die Überexpression von palmitoylierungsdefektem *ras1^{CCSS}* den letalen Effekt einer der Ras1-Depletion komplementieren kann, wurde die Palmitoylierungssequenz am endogenen Locus von Ras1 mutiert. Die Mutanten wiesen einen leichten Zellpolaritätsdefekt auf (siehe Abbildung 28). Der *ras1^{CCSS}*-Mutante (Ras1_{CCSSend}) wurde mit der konditionalen *ras1*-Mutante verglichen. Der Ras1_{CCSSend}-Stamm ist auf Arabinose-haltigem und Glukose-haltigem Medium in seinem Wachstum nicht beeinträchtigt ist (siehe Abbildung 27).

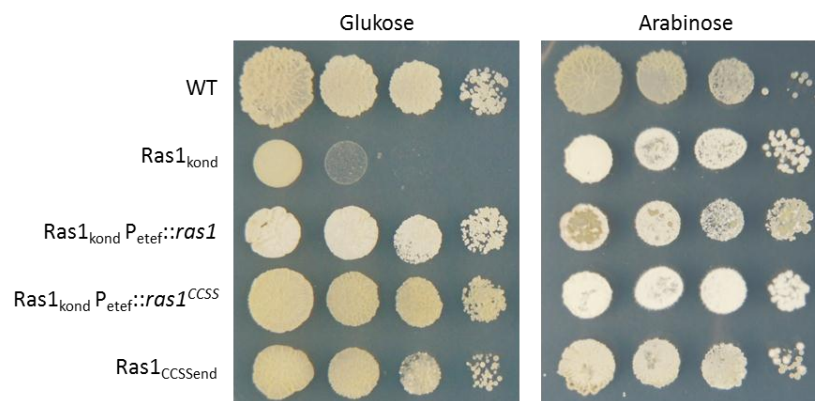


Abbildung 27: Tropftest des komplementierten Ras1_{kond}-Stammes und des Ras1_{CCSSend}-Stammes

Zellen des Bub8-, Ras1_{kond}-, Ras1_{kond}-P_{eteft}::ras1^{CCSS}-, Ras1_{kond}-P_{eteft}::ras1- und Ras1_{CCSSend}-Stammes wurden in Arabinose-haltigem Medium angezogen und daraufhin sowohl auf Glukose- als auch auf Arabinose-haltige YNB-Platten getropft.

Da die Palmitoylierung von Ras1 für die essentiellen Funktionen von Ras1 nicht entscheidend ist, wurde untersucht, welche zellulären Funktionen Ras1^{CCSS} ohne Palmitoylierungssignal ausgeführt werden können. Zunächst wurde die Kernverteilung der beiden Stämme untersucht. Eine Kernfärbung von wt-, Ras1_{kond}- und Ras1_{CCSSend}-Stämmen, die zwei Tage in reprimierendem Medium inkubiert wurden, zeigte, dass der Kernverteilungsdefekt von *ras1*-Mutanten in dem Ras1_{CCSSend}-Stamm nicht mehr zu beobachten war.

Die Vakuolenmorphologie der Ras1_{CCSSend}-Mutante war unbeeinträchtigt, während Zellen des Ras1_{kond}-Stammes auf reprimierendem Medium nach zwei Tagen sehr kleine Vakuolen akkumulierten (siehe Abbildung 28). Dies deutet darauf hin, dass Ras1 die Regulation der Vakuolenmorphologie von Endomembranen aus steuert.

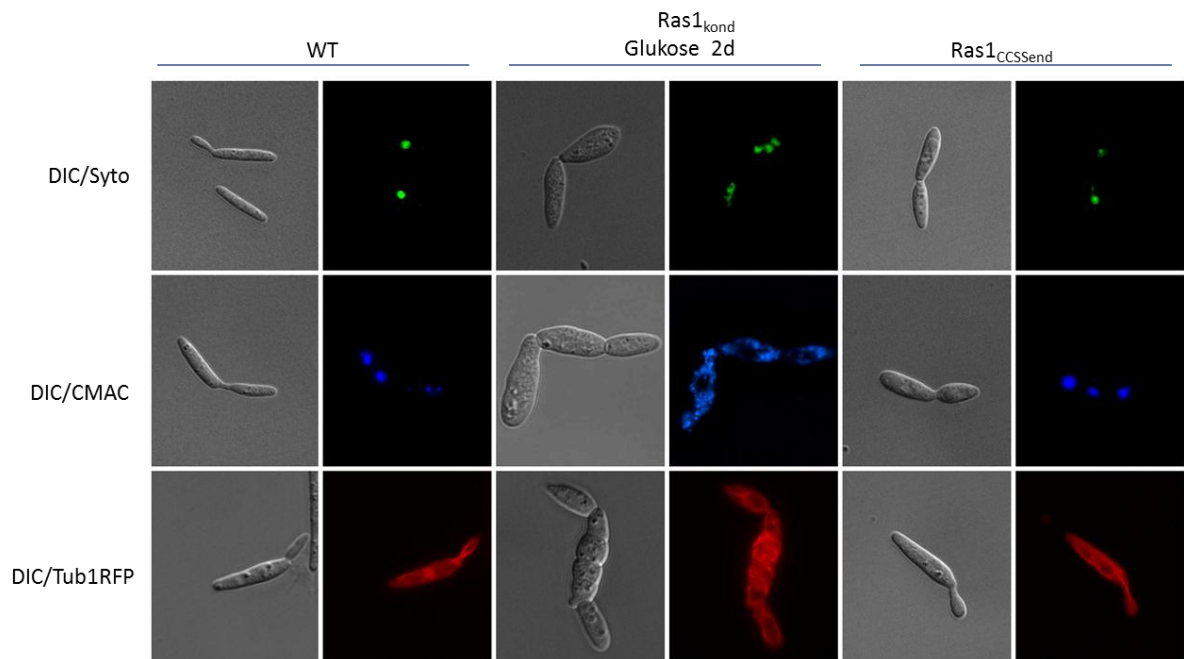


Abbildung 28: Analyse der Kernverteilung, der Vakuolenmorphologie und des Tubulinzytoskeletts des Ras1_{CCSSend}-Stammes

Der Ras1_{CCSSend}-, Ras1_{kond}- und Bub8-Stamm wurden erst auf Arabinose-haltigem Medium angezogen und dann 2 Tage auf Glukose-haltigem Medium wachsen gelassen. Die Kernverteilung wurde anhand einer Syto-Färbung, die Vakuolenmorphologie mittels CMAC-Färbung analysiert. Die Organisation des Tubulinzytoskeletts wurde mit Tub1RFP markiert. Der Ras1_{CCSSend}-Stamm zeigt eine wildtypische Kernverteilung, Vakuolenmorphologie und Organisation des Mikrotubulizytoskeletts.

2.10 Die Lokalisation von Ras1 an der Zytoplasmamembran ist essentiell für filamentöses Wachstum

Unter 2.9.1 wurde gezeigt, dass die Überexpression des palmitoylierungsdefekten *gfp-ras1^{CCSS}*-Alles nicht zu filamentösem Wachstum führt. Daher wurde untersucht, ob die Palmitoylierung von Ras1 eine essentielle Rolle bei der Regulation der morphologischen Transition einnimmt. In *U. maydis* sind einige Proteine bekannt, die neben Ras1 in der Lage sind, filamentöses Wachstum zu induzieren. Beispielsweise wurde die GTPase Rac1 als essentiell für die Regulation des polaren Wachstums beschrieben (Mahlert et al, 2006). Das bE/bW-Heterodimer wird nach der Bildung der dikaryotischen Hyphe gebildet und ist sowohl für ein stabiles Heterodikaryon als auch für das filamentöse Wachstum der Hyphe unerlässlich (Brachmann et al, 2001).

2.10.1 Die Überexpression von Rac1 führt in palmitoylierungsdefekten

Ras1-Stämmen nicht zu filamentösem Wachstum

Da Rac1 von entscheidender Bedeutung für filamentöses Wachstum ist, wurde untersucht, ob die Filamentinduktion durch Überexpression von Rac1 Plasmamembranassoziiertes Ras1 benötigt. Hierfür wurde *rac1* in dem Ras1^{CCSSend}-Stamm überexprimiert. Es war kein filamentöses Wachstum zu beobachten, die Zellen wiesen eine unveränderte Zellform auf (siehe Abbildung 29). Dies deutet darauf hin, dass die Palmitoylierung von Ras1 essentiell für die Rac1 induzierte Filamentbildung ist.

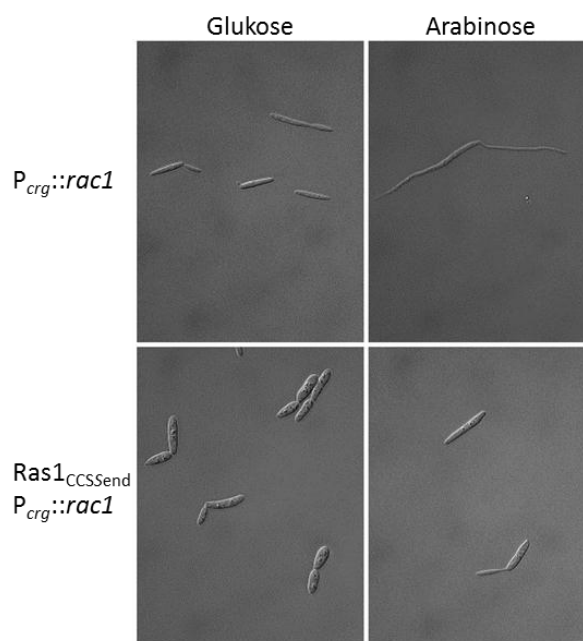


Abbildung 29: Die Überexpression von Rac1 führt ohne Palmitoylierung von Ras1 nicht zu filamentösem Wachstum

Die Überexpression von *rac1* unter der Kontrolle des *crg*-Promotors führt auf Arabinose enthaltendem Medium zur Ausbildung von Filamenten. Ohne palmitoyliertes Ras1 ist nach der Induktion der Expression von Rac1 kein filamentöses Wachstum zu beobachten.

2.10.2 In Abwesenheit von Ras1 an der Zytoplasmamembran induziert das

bE/bW-Heterodimer kein filamentöses Wachstum

Es konnte gezeigt werden, dass die Palmitoylierung von Ras1 für die Filamentbildung nach Rac1-Überexpression essentiell ist. Überexpression des bE/bW-Heterodimers

induziert ebenfalls filamentöses Wachstum (Brachmann et al, 2001). Die durch bE/bW induzierten Filamente entsprechen nach der Kreuzung gebildeten Filamenten, sind jedoch haploid. Um zu testen, ob die Lokalisation von Ras1 an der Zytoplasmamembran ebenfalls für die bE/bW induzierte Filamentbildung essentiell ist, wurde das Palmitoylierungssignal von Ras1 sowohl in AB31 als auch in AB33 Zellen mutiert (Brachmann et al, 2001). Die Induktion der Expression des bE/bW-Heterodimers führt in Abwesenheit von palmitoyliertem Ras1 weder in AB31 noch in AB33 zu filamentösem Wachstum (siehe Abbildung 30). Dies deutet darauf hin, dass die Palmitoylierung von Ras1 eine entscheidende Rolle beim filamentösen Wachstum erfüllt.

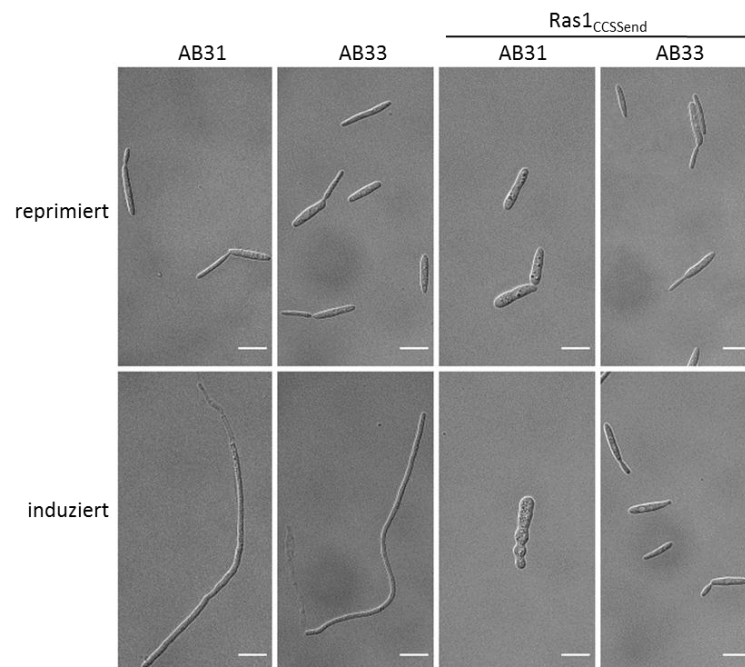


Abbildung 30: Palmitoylierung von Ras1 ist notwendig für b induzierte Filamentbildung

AB31 exprimiert auf Arabinose-haltigem Medium den bE/bW-Heterodimer, dies führt zur Ausbildung von Filamenten. Wird in diesem Stamm die Palmitoylierungsstelle in Ras1 mutiert, kann keine Induktion von Filamenten auf induzierendem Medium mehr beobachtet werden. Der gleiche Effekt konnte in AB33 beobachtet werden, der auf Nitrat-haltigem Medium den bE/bW-Heterodimer exprimiert.

2.11 Die Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul ist unabhängig von der Palmitoylierung von Ras1

In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass die Überexpression von Ras1 bzw. Ras1^{G18V} zur Aktivierung der GTPase Rac1 führt. Die Überexpression von Rac1 in dem Ras1^{CCSSend}-Stamm induziert kein Filament, sondern führt zur Bildung vergrößerter Vakuolen. Es wurde nun untersucht, ob die Überexpression des *ras1^{CCSS}*-Alles ebenso wie die des wildtypischen *ras1*-Alles das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul aktivieren kann.

2.11.1 Ras1^{G18VCCSS} aktiviert das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul

Um zu untersuchen, ob das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul von Plasmamembran- oder von Endomembran-assoziiertem Ras1 aktiviert wird, wurde die Cdc24-Stabilität nach Überexpression von palmitoylierungsdefektem Ras1 untersucht. Hierfür wurde das Cdc24GFP-Level in Abhängigkeit von *ras1^{CCSS}* bzw. *ras1^{G18VCCSS}* bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass nach Überexpression von *ras1^{CCSS}* Cdc24 nicht degradiert wird. Allerdings ist ein Abbau von Cdc24 nach der Überexpression von *ras1^{G18VCCSS}* zu erkennen (siehe Abbildung 31). Dies deutet darauf hin, dass das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul nur durch dominant aktives palmitoylierungsdefektes Ras1 abgebaut wird, nicht jedoch von Ras1^{CCSS}. Dies lässt zwei Vermutungen zu: Zum einen ist es möglich, dass Ras1 an Endomembranen nicht aktiv genug vorliegt. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass ein GEF, der Ras1 an Endomembranen aktivieren kann, einen limitierenden Faktor für diesen Nachweis darstellt. Möglicherweise wird das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul in wildtypischen Zellen nicht an Endomembranen von Ras1 aktiviert oder nicht so drastisch aktiv, dass ein Abbau von Cdc24 erfolgt.

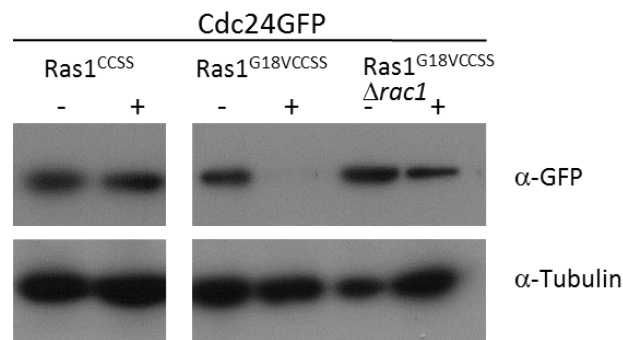


Abbildung 31: Überexpression von Ras1^{G18VCCSS} führt zur Degradation von Cdc24GFP

Die Stämme Bub8-*P_{etef}::cdc24gfp-P_{crg}::ras1^{CCSS}*, Bub8-*P_{etef}::cdc24gfp-P_{crg}::ras1^{G18VCCSS}* und Bub8-*Δrac1-P_{etef}::cdc24gfp-P_{crg}::ras1^{G18VCCSS}* wurden in Glukose-haltigem Medium angezogen und danach 6 Stunden in Arabinose-haltigem Medium inkubiert. Es wurden sowohl aus den auf Glukose gewachsenen Kulturen als auch auf den auf Arabinose gewachsenen Kulturen Proteine präpariert und das Cdc24GFP-Proteinlevel auf einem Westernblot analysiert.

2.11.2 Palmitoylierungsdefektes, dominant aktives Ras1 führt zur

Lokalisation von Cdc24 an Endomembranen

Nach mikroskopischer Analyse der Cdc24GFP Lokalisation zeigte sich, dass Cdc24GFP nach Überexpression von *ras1^{G18VCCSS}* an Endomembranen rekrutiert wurde (siehe Abbildung 32). Dies war jedoch nicht der Fall nach Überexpression von *ras1^{CCSS}*; hier lokalisierte Cdc24GFP zytoplasmatisch. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul dort lokalisiert und aktiviert wird, wo aktives Ras1 vorhanden ist.

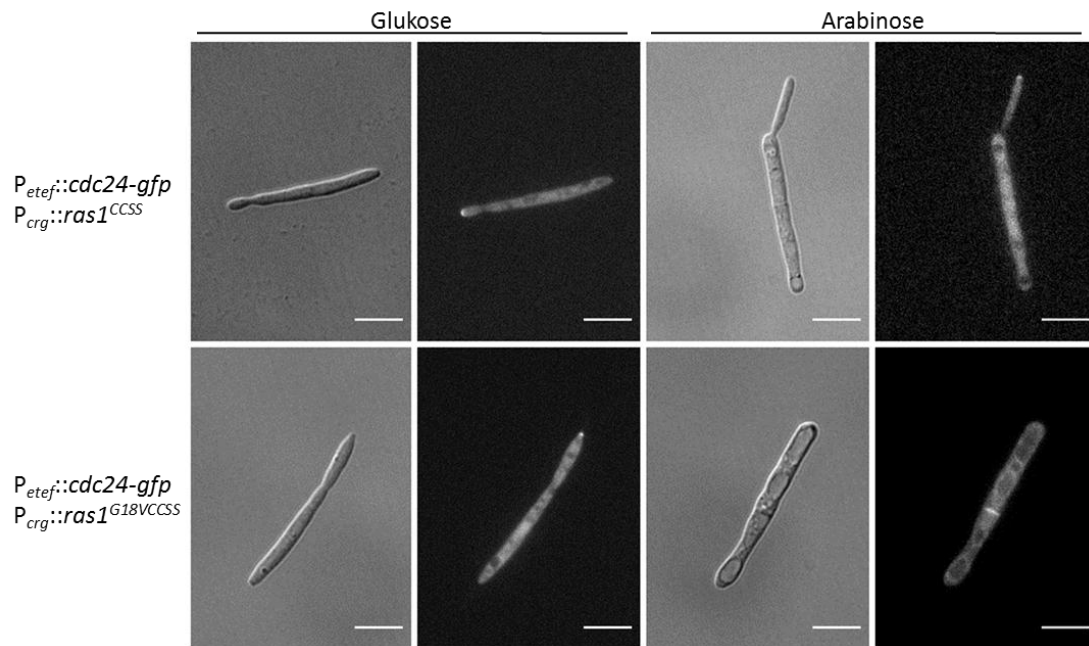


Abbildung 32: Überexpression von *ras1^{G18VCCSS}* führt zur Lokalisation von Cdc24GFP an Endomembranen und an Septen

Die Überexpression von *ras1^{CCSS}* und *ras1^{G18VCCSS}* wurde durch eine 6-stündige Inkubation auf Arabinose-haltigem Medium in Anwesenheit von Cdc24GFP induziert. Während Cdc24GFP nach Überexpression von *ras1^{CCSS}* an der Zellspitze lokalisiert, führt die Überexpression von *ras1^{G18VCCSS}* zur Lokalisation von Cdc24GFP an Endomembranen und an Septen.

2.12 Aktivatoren von RasGTPasen in *U. maydis*

Da die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse Fragen bezüglich der Aktivierung von Ras1 aufwerfen, wurden aktivierende Proteine, die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), identifiziert und untersucht. Charakteristisch für Ras-spezifische GEFs sind zwei Proteindomänen, zum einen die katalytische RasGEF-Domäne und zum anderen ein konserviertes N-terminales Motiv. Im Genom von *U. maydis* sind fünf Gene enthalten, die für Proteine kodieren, die diese beiden Domänen beinhalten. Dies sind Sql2, Tfh1, Ale1, Bem2 und Lte1 (siehe Abbildung 33). Während Tfh1, Ale1, Bem2 und Lte1 in *U. maydis* noch nicht charakterisiert wurden, wurde Sql2 bereits bei einem genetischen Screen nach Suppressoren des aktivierten cAMP-Signalweges identifiziert (Müller et al, 2003). In dieser Studie wurde beschrieben, dass die Überexpression von Sql2 zu filamentösem Wachstum führt. Deletionsmutanten sind noch in der Lage zu kreuzen, weisen jedoch einen Pathogenitätsdefekt auf. Lte1 wurde in anderen pilzlichen Modellorganismen wie

S. cerevisiae stets als GEF für die RasGTPase Rsr1 beschrieben, weshalb Lte1 in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde. Um mehr Information über die Aktivierung von RasGTPasen in *U. maydis* zu erhalten wurden sowohl die Spezifität der RasGEF-Domänen enthaltenden Proteine gegenüber Ras1 und Ras2 als auch deren zelluläre Funktion und intrazelluläre Lokalisation bestimmt.

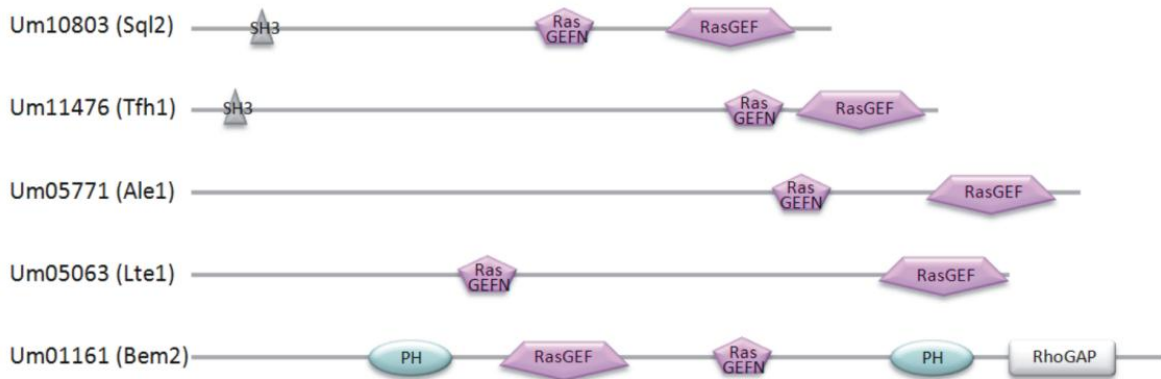


Abbildung 33: RA-Domänen enthaltende Proteine in *U. maydis*

Im Genom von *U. maydis* sind fünf Gene enthalten, die für Proteine kodieren, die eine RasGEF Domäne und ein N-terminales Motiv enthalten. Dies sind Sql2, Tfh1, Ale1, Lte1 und Bem2. Die RasGEF spezifischen Domänen sind als rosafarbene Fünfecke dargestellt.

2.12.1 Charakterisierung der Spezifität von RasGEF-Proteinen in *U. maydis*

Um die Spezifität der potentiellen RasGEFs gegenüber Ras1 und Ras2 zu bestimmen, wurden *in vitro* GEF-Assays durchgeführt. Für diese Versuche wird eine aufgereinigte GTPase mit einer aufgereinigten RasGEF-Domäne inkubiert. Zusätzlich wird ein fluoreszierendes GDP-Analog, das N-methylantraniolyl-GDP (mantGDP) eingesetzt. Dieses hat die Eigenschaft, seine Fluoreszenz zu erhöhen, wenn es an einer GTPase-gebunden vorliegt (siehe Abbildung 34). In diesem Ansatz kann photometrisch verfolgt werden, wenn ein Nukleotidaustausch durch den getesteten GEF katalysiert wird. Werden in diesem *in vitro*-Assay die GTPase, der GEF und das mantGDP vereint und der GEF ist in der Lage den Nukleotidaustausch von GDP zu mantGDP zu katalysieren, resultiert dies in einem Anstieg der Fluoreszenz (Neal et al, 1990).

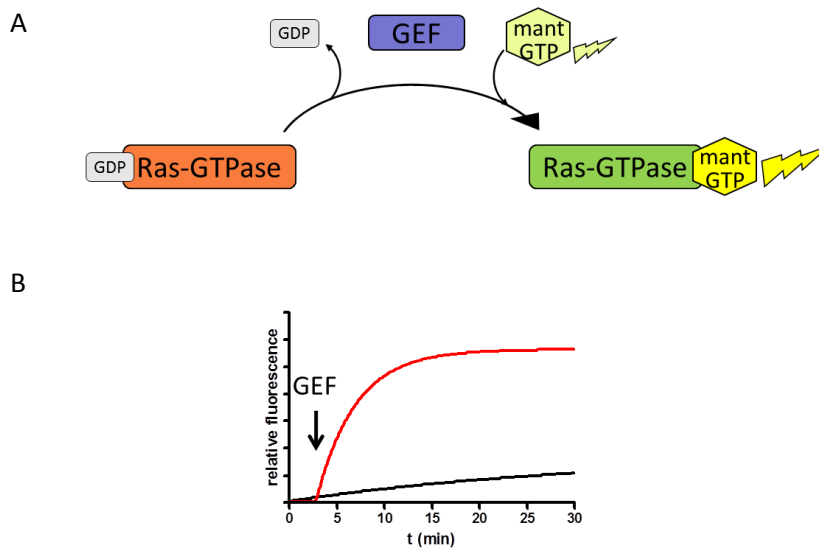


Abbildung 34: Schematische Darstellung des *in vitro* GEF-Assays

Zur Durchführung des GEF-Assays werden sowohl die RasGTPasen, als auch die RasGEF-Domänen als GST-Fusionsproteine aufgereinigt. Im Assay wird eine GEF-Domäne zu der GTPase und mantGDP gegeben. Katalysiert der GEF den Nukleotidaustausch an der GTPase, kommt es zur Bindung von mantGDP und zu einem Anstieg der Fluoreszenz (A). Schematischer Graph, der den Anstieg der Fluoreszenz beim Verlauf eines GEF-Assays zeigt. Nach Zugabe der GEF-Domäne (Pfeil) steigt die Fluoreszenz an (rote Linie). Ohne katalysierenden GEF zeigt sich ein geringer Anstieg der Fluoreszenz, die dem spontanen Nukleotidaustausch der GTPase entspricht (schwarze Linie) (B).

2.12.2 Die RasGEFs Sql2 und Tfh1 katalysieren den Nukleotidaustausch an Ras1

Es war vermutet worden, dass Sql2 ein Ras2 spezifischer GEF ist, da er, wie auch dominant aktives Ras2, nach Überexpression Filamentbildung induziert. Um die Spezifität der RasGEF-Domäne von Sql2 und Tfh1 gegenüber Ras1 oder Ras2 zu ermitteln, wurden, in Zusammenarbeit mit Kay Schink, *in vitro* GEF-Assays durchgeführt. Es wurden sowohl die beiden GTPasen Ras1 und Ras2 als auch die RasGEF-Domänen von Sql2 und Tfh1 aufgereinigt.

Zur Durchführung des *in vitro* GEF-Assays wurden die GEF-Domänen mit den aufgereinigten Ras1- oder Ras2-Proteinen inkubiert. Die RasGTPasen wurden auch ohne Zugabe der GEF-Domäne mit mantGDP inkubiert, um den spontanen Austausch der GTPasen ohne GEF zu verfolgen. In dem GEF-Assay ist ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe der Sql2 GEF-Domänen oder der Tfh1 GEF-Domäne zur

GTPase Ras1 im Vergleich zur Ras1 Kontrolle ohne GEF-Domäne zu erkennen. Bei der Zugabe der Sql2- oder Tfh1-GEF-Domäne zu Ras2 konnte kein Anstieg der Fluoreszenz im Vergleich zu der Ras2 Kontrolle ohne GEF-Domäne gemessen werden (siehe Abbildung 35). Somit konnte mittels dieses *in vitro* GEF-Assays eine strikte Spezifität von Sql2 und Tfh1 gegenüber Ras1 nachgewiesen werden.

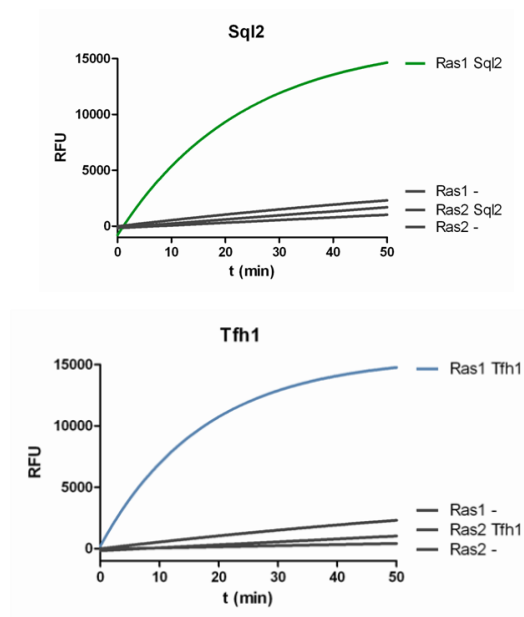


Abbildung 35: GEF-Assay zur Analyse der GEF-Spezifität von Sql2 und Tfh1

Dargestellt ist der GEF-Assay der GEF-Domänen von Sql2 und Tfh1. Die Spezifität von Sql2 und Tfh1 wurden für die GTPasen Ras1 und Ras2 untersucht. Ein Anstieg der Fluoreszenz konnte nach der Zugabe der Sql2 und Tfh1 GEF-Domänen zu Ras1 gemessen werden (grüne Linie Sql2, blaue Linie Tfh1).

2.12.3 Der Ras1 GEF Sql2 aktiviert das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul

Da die Überexpression von Sql2, wie bereits beschrieben (Müller 2003), zu filamentösem Wachstum führt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob dies durch eine Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmoduls vermittelt wird. Hierfür wurde Sql2 unter der Kontrolle des *crg*-Promotors in einem Cdc24GFP exprimierenden Stamm eingebracht. Nach Induktion der Sql2 Expression wurde die Stabilität des Cdc24GFP Proteins mittels Westernblot untersucht (siehe Abbildung 36). Dieser Versuch zeigte, dass die Expression von Sql2 zur Degradation von Cdc24GFP führt. Dies bedeutet, dass die Überexpression von Sql2 nicht nur zur Filamentbildung, sondern auch zur Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem2-Signalmoduls führt.

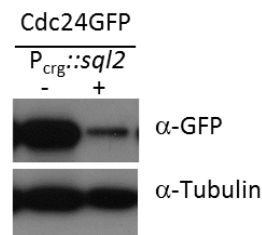


Abbildung 36: Überexpression von *Sql2* führt zur Degradation von *Cdc24GFP*

Das Cdc24-Proteinlevel ist nach 6-stündiger Induktion der *sql2*-Expression unter der Kontrolle des *crg*-Promotors deutlich reduziert.

2.12.4 Der Ras1-spezifische GEF Tfh1 ist ein Regulator der Zellmorphologie

Um die zellulären Funktionen von Tfh1 zu untersuchen, wurden Deletions- und Überexpressionsmutanten erstellt. Hierzu wurde sowohl ein Deletionskonstrukt als auch ein Konstrukt zum Einbringen des induzierbaren *crg*-Promotors vor den *tfh1* ORF konstruiert. Die Transformation dieser beiden Konstrukte in *U. maydis* Zellen führte jedoch nicht zu den erwarteten Mutanten. Die Überexpression von *tfh1* von einem im *ip*-Locus integrierten Konstrukt, welches den *tfh1*-ORF unter der Kontrolle des *crg*-Promotors enthielt, zeigte, dass die Zellen auf induziertem, Arabinose-haltigem Medium einen Defekt in ihrer Zellmorphologie aufwiesen (siehe Abbildung 37). Darüber hinaus stellten *tfh1*-überexprimierende Zellen ihr Wachstum ein. Da die Überexpression von Tfh1 anscheinend letal ist, konnten auch auf induziertem Medium keine konditionale Mutante erstellt werden. Die Überexpression von Tfh1 zeigte, dass Tfh1 an der Aufrechterhaltung der Zellmorphologie beteiligt ist. Um zu untersuchen, in welchen zellulären Kompartimenten Tfh1 lokalisiert, wurde ein Tfh1GFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des *crg*-Promotors Zellen exprimiert. Nach der Induktion der Expression wurden die Zellen mikroskopisch untersucht (siehe Abbildung 37). Das Tfh1GFP Fusionsprotein lokalisiert sowohl an der Zytoplasmamembran als auch an Endomembranen. Die Überexpression von Tfh1GFP führt zur Ausbildung der gleichen morphologischen Veränderungen wie Überexpression von Tfh1. Dies deutet darauf hin, dass die GFP-Fusion an Tfh1 die zellulären Funktionen von Tfh1 nicht beeinträchtigt. Insgesamt deuten diese

Ergebnisse darauf hin, dass Tfh1 der GEF ist, der Ras1 an Endomembranen für die essentiellen Funktionen der GTPase aktiviert.



Abbildung 37: Überexpression des Ras1-spezifischen GEFs Tfh1

Die Überexpression von Tfh1GFP führt zu einer morphologischen Veränderung der Zellform. Tfh1GFP lokalisiert an der Zytoplasmamembran und an Endomembranen.

2.12.5 Die Überexpression von Tfh1 führt zur Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmoduls

In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass Tfh1 den Nukleotidaustausch an Ras1 katalysieren kann und dass Tfh1 an der Regulation der Zellmorphologie beteiligt ist. Um zu untersuchen, ob die Überexpression von Tfh1 in der Lage ist, durch die Aktivierung von Ras1, das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul zu aktivieren, wurde die Stabilität des Cdc24 Proteins untersucht. Hierfür wurde Tfh1 unter der Kontrolle des *crg*-Promotors in einen Stamm eingebracht, der Cdc24GFP konstitutiv unter der Kontrolle des *etef*-Promotors exprimiert. In einem Westernblot wurde die Stabilität von Cdc24GFP analysiert. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Tfh1 zur Degradation von Cdc24GFP führt (siehe Abbildung 38). Des Weiteren konnte durch mikroskopische Analysen gezeigt werden, dass die Überexpression von Tfh1 ähnlich wie die Überexpression von *ras1^{GVCCSS}* in einer Lokalisation von Cdc24GFP an Endomembranen resultiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass Tfh1, höchstwahrscheinlich durch eine Aktivierung von Ras1, das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul aktivieren kann.

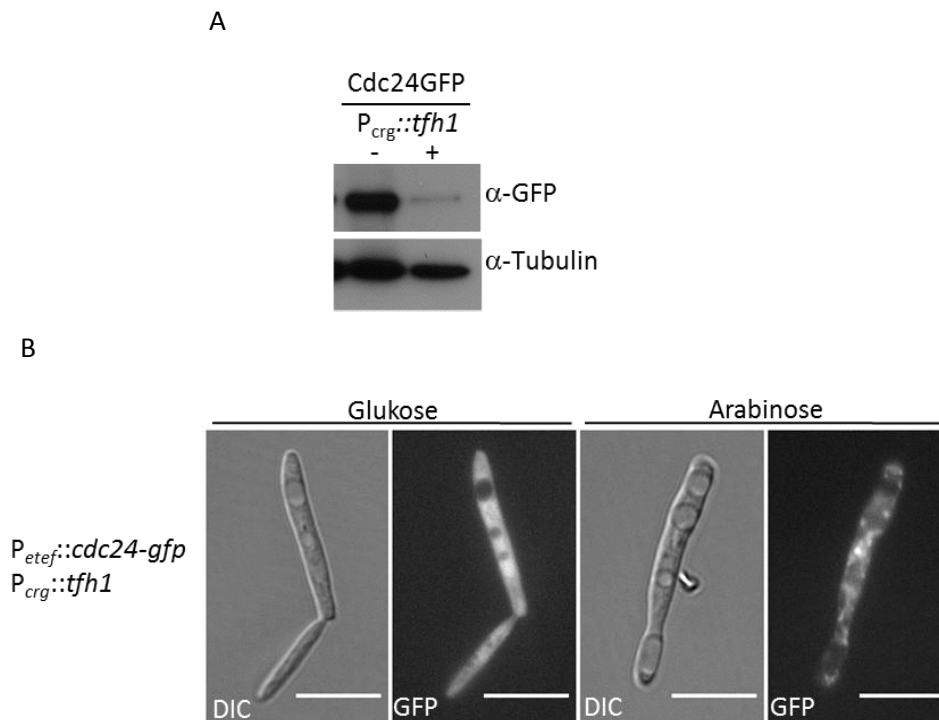


Abbildung 38: Tfh1 aktiviert das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul

Das Cdc24-Proteilevel ist nach 6-stündiger Induktion der *tfh1*-Expression unter der Kontrolle des *crg*-Promotors deutlich reduziert (A). Die Überexpression von *tfh1* führt zur Delokalisation von Cdc24GFP (B).

2.12.6 Ale1 ist ein GEF spezifisch für Ras2

Das Protein Ale1 in *U. maydis* weist eine RasGEF-Domäne und N-terminales Motiv auf. Auch für Ale1 wurde ein *in vitro* GEF-Assay durchgeführt. Nach der Aufreinigung der Ale1 RasGEF-Domäne mit N-terminalem Motiv wurde diese Domäne mit Ras1 oder Ras2 inkubiert. Dieser Versuch zeigte, dass Ale1 spezifisch den Nukleotidaustausch an Ras2 katalysiert (siehe Abbildung 39). Ein Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe der Ale1 RasGEF-Domäne war nur in der Reaktion zu messen, die Ras2 enthielt. Dies bedeutet, dass Ale1 ein Ras2-spezifischer RasGEF ist.

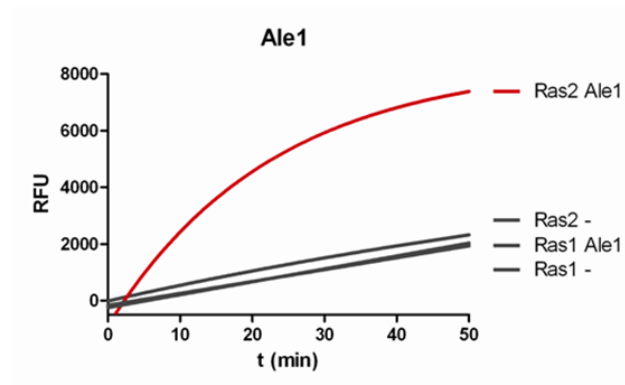


Abbildung 39: Ale1 kann den Nukleotidaustausch an Ras2 katalysieren

Dargestellt ist der GEF-Assay der GEF-Domänen von Ale1. Die Spezifität von Ale1 wurde für die GTPasen Ras1 und Ras2 untersucht. Ein Anstieg der Fluoreszenz konnte nach der Zugabe der Ale1 GEF-Domänen zu Ras2 gemessen werden (rote Linie).

3 Diskussion

3.1 Das filamentöse Wachstum in *U. maydis*

Polarisiertes Wachstum ist essentiell bei der Ausbildung der unterschiedlichen Zellmorphologien von Eukaryoten. Für *U. maydis* ist stark polarisiertes Wachstum eine entscheidende Voraussetzung beim Umschalten vom hefeartigen Wachstum zum filamentösen Wachstum der infektiösen Pilzhyphe (Christensen, 1963). Um die Wirtspflanze *Zea mays* zu infizieren, bilden kompatible haploide Sporidien Konjugationshyphen aus, die ihren Zellzyklus arretieren, durch einen Pheromongradienten aufeinander zuwachsen und fusionieren (García-Muse et al, 2003; Spellig et al, 1994). Es bildet sich ein dikaryotisches Filament, das eine Länge von ca. 150 µm aufweist. Diese dikaryotische Hyphe kann mit einer Geschwindigkeit von 1,5 µm/min wachsen (Steinberg et al, 1998). Hierbei werden *retraction septa* gebildet, durch die, während des Wachstums, zytoplasmafreie Abschnitte entstehen. Der dimere Homeodomänen Transkriptionsfaktor b ist ein zentraler Regulator für die Ausbildung infektiöser Hyphen (Schulz et al, 1990). Außerdem wurden mehrere Signalmodule charakterisiert, durch die das Pheromonsignal in der Zelle transduziert wird. Dies sind zum einen der cAMP-Signalweg und zum anderen eine MAPK-Kaskade, die durch G-Proteine aktiviert werden (Kahmann et al, 1999; Lee & Kronstad, 2002). Beide Signalwege aktivieren den Transkriptionsfaktor Prf1, der wiederum die Transkription von b stimuliert (Kaffarnik, 2003). Die konstitutive Expression eines aktiven bE/bW-Heterodimers führt zur Ausbildung von haploiden solopathogenen Stämmen; die Pathogenität ist jedoch auch in diesen Stämmen abhängig vom Vorhandensein der MAPK (Kämper, 2006; Müller, 2003).

Neben diesem Pheromon-, bzw. b-induzierten Hyphenwachstum, kann *U. maydis* durch Überexpression der kleinen GTPase Ras1 Filamente ausbilden (Mahlert, 2006). Außerdem ist bekannt, dass in *U. maydis* Ras1 für die Ausbildung der länglichen Zellform essentiell ist (Mahlert, 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ras1-Depletionsmutanten ein stark dereguliertes Aktin- und Tubulinzytoskelett aufweisen. Klare Aktin-*patches* oder Aktin-*cables* waren nicht mehr zu erkennen, die Orientierung der Mikrotubuli in der Zelle erschien willkürlich. Die Organisation des Aktinzytoskeletts wird in *U. maydis* außerdem durch die beiden RhoGTPasen, Rac1 und

Cdc42 beeinflusst (K. Schink, persönliche Mitteilung). Überexpression von Rac1 führt ebenso wie die Überexpression von Ras1 zur Ausbildung von Filamenten (Mahlert et al, 2006). Aus diesen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob und wie die Ras1- und Rac1-Signalwege miteinander verknüpft sind und die morphologische Entwicklung von *U. maydis* regulieren.

3.1.1 Ras1 aktiviert den Rac1-Signalweg während des filamentösen Wachstums

Es wurde untersucht, ob Rac1, das beim filamentösen Wachstum in *U. maydis* eine wichtige Rolle spielt, in Abhängigkeit von Ras1 während des filamentösen Wachstums aktiviert wird. Als Nachweis für eine Aktivierung von Rac1 kann die Stabilität des Rac1-spezifischen GEFs Cdc24 dienen. Wird Rac1 aktiviert, kommt es zur Ausbildung von Filamenten und auf Proteinebene zum Abbau des GEFs Cdc24 (S. Frieser, unveröffentlichte Daten). Es konnte gezeigt werden, dass nach Überexpression von Rac1 aber auch von Ras1, Ras1^{Q67L} oder Ras1^{G18V} ein Abbau von Cdc24 erfolgt. Dies deutet darauf hin, dass der Rac1 Signalweg von Ras1 aktiviert wird. In $\Delta rac1$ -Mutanten wurde nur eine schwache Abnahme des Cdc24 Proteinlevels nach Überexpression von *ras1*, *ras1*^{Q67L} oder *ras1*^{G18V} beobachtet. Das Cdc24-Proteinlevel nach Überexpression der *ras1*-Allele war jedoch niedriger als nach Deletion von *rac1* ohne Überexpression der *ras1*-Allele. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Cdc24 keine strikte Spezifität gegenüber Rac1 aufweist sondern auch die GTPase Cdc42 mit geringer Affinität aktivieren kann (Schink, 2010). Cdc42 scheint demnach die Funktionen von Rac1 partiell übernehmen zu können.

Daraus ergab sich die Frage nach den molekularen Grundlagen der Aktivierung des Rac1 Signalwegs durch Ras1. Mit Pulldown-Experimenten konnte eine schwache Interaktion von Ras1 und Cdc24 nachgewiesen werden. Dies ist jedoch kein eindeutiger Beweis für eine direkte Interaktion. Gegen eine direkte Interaktion der beiden Proteine spricht, dass in einem Pulldownexperiment mit aufgereinigtem Ras1-Protein und überexprimiertem Cdc24-Protein in Abwesenheit von Rac1 keine Interaktion nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich demnach vermutlich um eine indirekte Interaktion, die möglicherweise in einem Komplex erfolgt und von Rac1 vermittelt werden könnte. In einem weiteren Pulldown Experiment konnte eine Interaktion zwischen Ras1 und der MAPKKK Kpp4 gezeigt werden. Für diese Kinase ist bereits

bekannt, dass sie über ihre SAM-Domäne mit dem MAPKKK interagierenden Protein Ubc2 interagiert (Klosterman et al, 2008; Mayorga & Gold, 2001). Für Ubc2 konnte wiederum in dieser Arbeit eine Interaktion mit den RhoGTPasen Rac1 und Cdc42 gezeigt werden. Anhand dieser Interaktionen wäre ein größerer Komplex aus Ras1, Kpp4, Ubc2 und Rac1 vorstellbar (siehe Abbildung 40). Ein solcher Komplex könnte eine Verknüpfung der drei Signalwege in *U. maydis* darstellen, die alle eine wichtige Rolle bei der Bildung infektiöser Hyphen übernehmen.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit zellbiologische Experimente durchgeführt, die auf die Relevanz des oben beschriebenen Komplexes hinweisen. Die Überexpression von dominant aktivem Ras1 führt in wildtypischen *U. maydis*-Zellen zu einem Multiseptierungsphänotyp. In *ubc2*- bzw. *kpp4*-Deletionsmutanten ist dieser Phänotyp dagegen stark abgeschwächt. Ein weiterer Hinweis auf die Verbindung zwischen Ras1 und Cdc24 ergab sich auch aus der veränderten Lokalisation von Cdc24 in einem Stamm, der *ras1*^{G18V} exprimiert. Cdc24 befindet sich nicht mehr an der Zellspitze, sondern ist an der gesamten Zytoplasmamembran und an den Septen lokalisiert. Diese durch aktives Ras1 bedingte Delokalisation von Cdc24 ähnelt der von GFP-Ras1^{G18V}. Die Delokalisation war wiederum abhängig vom Vorhandensein von Ubc2.

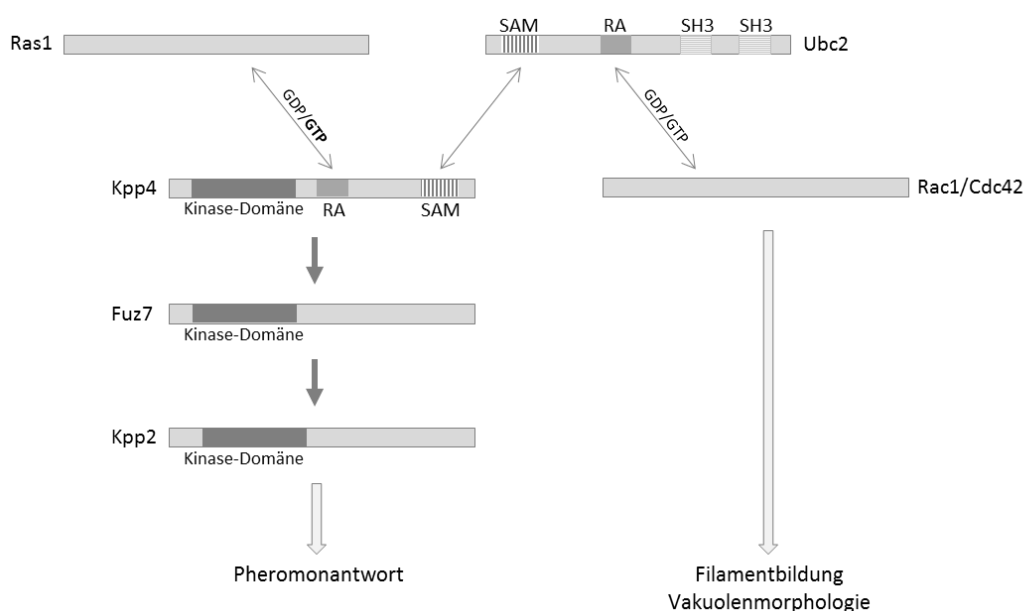


Abbildung 40: Modell zur Ausbildung eines höheren Proteinkomplexes

Dieses Modell stellt eine Möglichkeit dar, wie die Signalwege der MAPK-Kaskade und des Rac1-Signalweges verknüpft sein könnten. Hierbei interagiert Ras1 mit der MAPKKK Kpp4. Kpp4 interagiert wiederum mit Ubc2 und Ubc2 mit Rac1.

In anderen Modellorganismen wie *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *C. neoformans* konnte im Gegensatz zu *U. maydis* eine direkte Interaktion zwischen Ras-Homologen und Cdc24-Homologen gezeigt werden (Chang et al, 1994; Nichols et al, 2007; Zheng et al, 1995). Bei *S. cerevisiae* und *S. pombe* aktivieren die Cdc24-Homologe allerdings die GTPase Cdc42 (Ziman & Johnson, 1994). In *C. neoformans* konnte gezeigt werden, dass Cdc42 bei der Regulation des Zellwachstums unter erhöhten Temperaturen unterhalb von Ras1 agiert. Rac1 hat hingegen, ähnlich wie in *U. maydis*, unterhalb von Ras1 Funktionen während der Hyphenbildung bei der sexuellen Differenzierung. Wie die Signalweiterleitung von Ras1 auf Rac1 vonstattengeht ist jedoch bisher unbekannt; Cdc24 übernimmt jedoch bei dieser Signalweiterleitung in *C. neoformans* keine Funktion (Nichols et al, 2007).

In der Hefe *S. cerevisiae* wurde die Lokalisation und Aktivität von Cdc24 schon eingehend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Cdc24 sowohl an der Spitze der Knospe als auch im Zellkern lokalisiert. Es wird vermutet, dass diese Lokalisation eine Rolle bei der Aktivierung des GEFs übernimmt (Shimada et al, 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Cdc24 über seine DH-Domäne Oligomere bildet. Die Bildung von Oligomeren ist nicht entscheidend für die *in vitro* GEF-Aktivität, das Auflösen der Oligomere ist jedoch für den Export aus dem Zellkern zu der Knospenspitze nötig. Dort kann Cdc24 dann Cdc42 aktivieren (Mionnet et al, 2008). Einen weiteren Einfluss auf die Lokalisation von Cdc24 übt die RasGTPase Rsr1 aus. Hierbei wird Cdc24, nach Aktivierung durch Rsr1, mittels des GEFs Bud5 an die Zellspitze lokalisiert (Park et al, 2002).

In der Genomsequenz von *U. maydis* findet sich ebenfalls ein Homolog zu Rsr1. Untersuchungen dieses Rsr1-Homolog zeigten jedoch, dass im Gegensatz zu *rsr1*-Deletionsmutanten in *S. cerevisiae*, welche einen *random budding* Phänotyp aufweisen, *rsr1*-Deletionsmutanten in *U. maydis* lediglich eine verzögerte Knospung zeigen (Patzak, 2007). So besteht die Möglichkeit, dass die Rekrutierung von Cdc24/Rac1, die in *S. cerevisiae* von Rsr1 bewerkstelligt wird, in *U. maydis* durch Ras1 vorgenommen werden könnte.

3.1.2 Die Rolle der MAPK-Kaskade während des filamentösen Wachstums

Das durch Überexpression von *ras1* beschriebene filamentöse Wachstum wird, wie oben beschrieben, von der Aktivierung von Cdc24/Rac1 begleitet. Gleichzeitig legt die

beobachtete Interaktion von Ras1 mit der MAPKKK Kpp4 nahe, dass Ras1 auch für die Aktivierung der MAPK-Kaskade verantwortlich sein könnte. Die Überexpression einer konstitutiv aktiven MAPKK (*fuz7DD*) führt zu filamentösem Wachstum und zu einem Zellzyklusarrest (García-Muse et al, 2003; Müller, 2003). Konstitutiv aktives Ras1 aktiviert ebenfalls die MAPK-Kaskade, wie in dieser Arbeit unter 2.4.1 gezeigt wird. Nach der Überexpression von *ras1*, die zur Filamentbildung jedoch nicht zum Zellzyklusarrest führt, konnte allerdings keine Aktivierung der MAPK-Kaskade nachgewiesen werden. Die Überexpression von *fuz7DD* und *ras1* resultieren also beide in filamentösem Wachstum, haben jedoch unterschiedliche Einflüsse auf die MAPK-Kaskade und den Zellzyklus. Dies zeigt, dass die Aktivierung der MAPK-Kaskade von mehr abhängt als von der Aktivität von Ras1. Dass die MAPK-Kaskade essentiell für die durch Ras1 induzierbare Filamentbildung ist, zeigen die unter 2.6 dargestellten Versuche. Eine Überexpression von *ras1* oder *rac1* in $\Delta kpp4$ -Stämmen führte nicht zu filamentösem Wachstum. Das Vorhandensein der MAPK-Kaskade könnte entweder per se notwendig für filamentöses Wachstum sein oder aber die Interaktionen zwischen Ras1, Kpp4, Ubc2 und Rac1 kommen ohne Kpp4 nicht mehr zustande. Unterstützt wird die zweite Hypothese durch ein Experiment, in der die RA-Domäne von Kpp4 (*kpp4^{K481E}*) so mutiert wurde, dass sie in einem Hefe-zwei-Hybrid Experiment nicht mehr mit Ras1 interagiert. Diese *Kpp4^{K481E}*-Stämme waren in der Lage, mit wt-Zellen zu kreuzen, während in Kreuzungen aus *FB1kpp4^{K481E}* und *FB2kpp4^{K481E}* keine Filamentbildung zu beobachten war. Nach Zugabe von synthetischem Pheromon war die Filamentbildung um 77 % reduziert, verglichen mit wt-Zellen (Müller, 2003). Diese Experimente deuten darauf hin, dass die Interaktion der RA-Domäne von Kpp4 mit Ras1 für den Kreuzungsvorgang notwendig ist. Da durch Pheromonzugabe die Filamentbildung in Stämmen mit mutierter RA-Domäne von Kpp4 reduziert ist, lässt dies vermuten, dass die RA-Domäne von Kpp4 für eine vollständige Aktivierung der MAPK-Kaskade beziehungsweise zumindest für das filamentöse Wachstum notwendig ist.

Eine mögliche Funktion der RA-Domäne von Kpp4 könnte die Ausbildung des Ras1/Kpp4/Ubc2/Rac1-Signalmoduls sein. Die Ausbildung dieses Komplexes kann jedoch nicht die einzige Funktion der MAPK-Kaskade während der Ras1 induzierten Filamentbildung sein, denn das Vorhandensein weiterer Komponenten der MAPK-Kaskade ist ebenfalls essentiell für das filamentöse Wachstum. Auch in $\Delta fuz7$ -Stämmen kann weder durch *ras1*- noch durch *rac1*-Überexpression Filamentbildung induziert

werden. Welche Funktionen die MAPK-Kaskade während des filamentösen Wachstums übernimmt, kann bislang nicht vollständig erklärt werden, da eine Aktivierung der MAPK-Kaskade während der *ras1*-induzierten Filamentbildung nicht nachzuweisen war. Daher könnte auch das Vorhandensein der Grundaktivität der MAPK-Kaskade essentiell für die Filamentinduktion sein. Komponenten der MAPK-Kaskade, die direkt mit Ras1 interagieren und auch solche, die nicht mit Ras1 interagieren, sind eine Voraussetzung für filamentöses Wachstum. Die Interaktion zwischen Ras1 und Kpp4 ist zumindest in Anwesenheit von Fuz7DD nicht notwendig, um Filamente zu induzieren. Fuz7DD kann den Phänotyp einer *kpp4*-Deletion komplementieren (Müller, 2003). Ob also die zuvor gezeigte indirekte Interaktion zwischen Kpp4 und Rac1 über Ubc2 die einzige Möglichkeit ist Rac1 zu aktivieren, ist daher unwahrscheinlich. In diesem Kontext könnte die Cdc24-Stabilität in Abhängigkeit von Kpp4 und Fuz7DD bestimmt werden, um Aufschlüsse über die Menge an aktivem Rac1 zu erhalten. Außerdem müsste untersucht werden, ob die Lokalisation von Cdc24 von Fuz7DD beeinflusst werden kann, wie für Ras1^{G18V} gezeigt wurde. Es ist durchaus vorstellbar, dass die Interaktionskette zwischen Ras1 und Cdc24 nur eine Art Fine-Tuning darstellt, um drei Signalmodule (MAPK-Kaskade, Ras1-Modul und Rac1-Modul) miteinander zu koordinieren. Alle drei Module sind maßgeblich am filamentösen Wachstum beteiligt und daher wahrscheinlich eng vernetzt.

3.2 Die essentiellen Funktionen von Ras1 werden von Endomembranen aus gesteuert

Kleine GTPasen der Ras-Familie unterliegen verschiedenen posttranskriptionellen Modifikationen. Zum einen wird die C-terminale CAAX-Box proteolytisch gespalten, carboxymethyliert und an der SH-Gruppe des Cysteins prenyliert. Diese hydrophobe Modifikation ist notwendig, aber in der Regel nicht hinreichend für die Lokalisation der GTPase an der Zytoplasmamembran. Zusätzlich finden sich am C-Terminus der Proteine Sequenzen, die für die Membran-Lokalisation von Ras-Proteinen mit entscheidend sind. Diese beinhalten entweder eine Palmitoylierungsstelle (*H. s.* H-Ras, *H. s.* N-Ras, *U. m.* Ras1), oder eine polybasische Region (*H. s.* K-Ras, *H. s.* N-Ras, *U. m.* Ras2). Die Palmitoylierung von H-Ras und N-Ras findet nach der CAAX-Box Modifikation am Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Anschließend werden H-Ras und N-Ras vom ER an die Zytoplasmamembran transportiert (Boyartchuk et al, 1997;

Clarke et al, 1988; Dai et al, 1998; Hancock et al, 1990; Lobo et al, 2002; Rocks et al, 2005). Neben der hier beschriebenen C-terminalen Modifikation wurde im Fall von H-Ras beschrieben, dass auch der Beladungszustand einen Einfluss auf die Lokalisation innerhalb der Zytoplasmamembran ausüben kann (Prior & Hancock, 2001; Rotblat et al, 2004; Roy et al, 2005). An der unterschiedlichen Lokalisation von H-Ras an der Zytoplasmamembran ist jedoch nicht nur der Beladungszustand, sondern auch die hypervariable Region (hvr) beteiligt, die vor der Palmitoylierungsstelle bzw. der polybasischen Region liegt. Ras1^{G12V}- Δ hvr lokalisiert im Gegensatz zu Ras1^{G12V} in *lipid rafts*. Auch hvr alleine lokalisiert außerhalb von *lipid rafts*, was der hypervariablen Region eindeutig eine Funktion bei der Verteilung von H-Ras innerhalb der Zytoplasmamembran zuweist (Rotblat et al, 2004).

Dass die Palmitoylierung von Ras-Homologen auch in Pilzen stattfindet, wurde bereits in *S. pombe* und *C. neoformans* gezeigt. Die Genomsequenz von *S. pombe* codiert nur für ein Ras-Homolog, Ras1. Eine Studie, in der Ras1 so modifiziert wurde, dass es entweder nur an der Zytoplasmamembran oder an Endomembranen lokalisiert, konnte nachweisen, dass die intrazelluläre Lokalisation von Ras1 eine entscheidende Bedeutung für die Signalspezifität ausübt. So ist die Palmitoylierung von Ras1 in *S. pombe* entscheidend für die Regulation der Zellmorphologie über den Ras1/Scd1/Cdc42-Signalweg, nicht jedoch für die Pheromonantwort über die Aktivierung der MAPK-Kaskade (Onken et al, 2006). Auch die Ras1 Proteinsequenz von *C. neoformans* weist zwei vor der CAAX-Box gelegene Cysteine auf, die beide palmitoyliert werden (Nichols et al, 2009). In *C. neoformans* ist die Palmitoylierung von Ras1 entscheidend für die reguläre Morphogenese und das Wachstum bei höheren Temperaturen. Dagegen ist die sexuelle Differenzierung unabhängig von der Palmitoylierung. Die Prenylierung der CAAX-Box ist aber für alle beschriebenen Ras1 Funktionen in *C. neoformans* unerlässlich (Nichols et al, 2009).

In *U. maydis* weist die Proteinsequenz von Ras1 ein Palmitoylierungssignal auf, während in der Sequenz von Ras2 eine polybasische Region enthalten ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Palmitoylierungsmotiv der hypervariablen Domäne von Ras1 eine entscheidende Rolle für die Lokalisation und Funktion der GTPase übernimmt. Ras1 mit mutierter Palmitoylierungsstelle lokalisiert nicht mehr an der Zytoplasmamembran, sondern an Endomembranen. Die Überexpression eines palmitoylierungsdefekten *ras1*-Allels in *U. maydis* führt im Gegensatz zur Überexpression von Ras1 nicht zu filamentösem Wachstum. Dies verdeutlicht, dass die

palmitoylierungsabhängige Lokalisation von Ras1 an der Zytoplasmamembran für das filamentöse Wachstum eine wichtige Rolle spielt. Interessanterweise komplementiert die Überexpression des palmitoylierungsdefekten *ras1^{CCSS}*-Allels die letale Auswirkung der *ras1*-Depletion. Eine *ras1^{CCSS}*-Mutante, bei der das Palmitoylierungsmotiv am endogenen Locus mutiert wurde, ist ebenfalls lebensfähig. Folglich ist für das Überleben von *U. maydis* die C-terminale Palmitoylierungssequenz und die damit zusammenhängende Lokalisation von Ras1 an der Zytoplasmamembran nicht essentiell. Zellen, die ausschließlich Ras1 mit mutierter Palmitoylierungsstelle exprimieren, weisen allerdings eine veränderte Zellmorphologie auf und sind weniger polarisiert als wildtypische Zellen. Die Morphologie der Vakuolen, das Zytoskelett und die Kernverteilung erscheinen jedoch wildtypisch (siehe Abbildung 28). Dieser Phänotyp unterscheidet sich deutlich von der deregulierten Vakuolenmorphologie, Zytoskelettorganisation und Kernverteilung der Ras1-depletierten Zellen. Ähnlich wie Zellen nach Ras1-Depletion weisen Zellen des *rac1*-Deletionsstammes eine gestörte Vakuolenmorphologie auf (Mahlert et al, 2006). Von daher könnte Rac1 auch ein Effektor von Ras1 an Endomembranen sein. Dominant aktives Ras1 führt interessanterweise auch an Endomembranen zu einer Destabilisierung von Cdc24. Überexpression von Ras1^{G18VCCSS} in Abwesenheit von Rac1 führt immer noch zu einer leichten Destabilisierung von Cdc24. Dies deutet darauf hin, dass auch in diesem Fall Cdc42 die Funktionen von Rac1 teilweise übernehmen kann. Dass Cdc42 Rac1 partiell substituiert, scheint ein generelles Prinzip zu sein. Ein weiterer deutlicher Hinweis darauf ist der stark ausgeprägte Vakuolenphänotyp der *cdc42-rac1*-Doppeldeletion im Vergleich zu den *cdc42*- oder *rac1*-Deletionsstämmen (Mahlert et al, 2006).

An der Zytoplasmamembran lokalisiertes Ras1 scheint eine wichtige Rolle beim filamentösen Wachstum zu übernehmen, da in dem Ras1^{CCSSend}-Stamm kein filamentöses Wachstum nach Aktivierung des bW/bE-Transkriptionsfaktors beobachtet wird. Auch eine durch Rac1 induzierte Filamentbildung ist nicht möglich. Durch Überexpression von dominant aktivem Ras1^{G18VCCSS} wird Cdc24 an Endomembranen lokalisiert. Normalerweise lokalisiert dieses Protein primär an der Zellspitze. Darüber hinaus sind diese Zellen nicht mehr hyperpolarisiert (siehe Abbildung 32). Ob diese Delokalisation von Cdc24 wiederum von Ubc2 abhängt, wurde allerdings nicht untersucht. Zur Verifizierung des Modells, in dem die MAPKKK Kpp4 und Ubc2 als Adapter zwischen Ras1 und Rac1 wirken, müsste diese Abhängigkeit untersucht werden. Insgesamt zeigen die Experimente mit nicht palmitoyliertem Ras1

deutlich, dass die Membranlokalisation von Ras1 eine entscheidende Funktion bei dem filamentösen Wachstum von *U. maydis* übernimmt. Dieses Protein kann auch weiterhin als wertvolles Werkzeug dienen, um die unterschiedlichen Aufgaben der GTPasen Ras1 und Rac1 in der Zelle zu verstehen und getrennt voneinander zu untersuchen.

3.3 Die Aktivatoren der RasGTPasen in *U. maydis*

Die Aktivierung und Inaktivierung von kleinen GTPasen spielt eine entscheidende Rolle bei der Signalweiterleitung. Es besteht allerdings häufig eine Diskrepanz zwischen der Anzahl der GEFs und GAPs zu den GTPasen. Dies dient sowohl der zeitlichen und räumlichen Koordination der GTPase-Aktivität als auch der Signalspezifität. RhoGTPase spezifische GEF-Proteine spielen im humanen System eine wichtige Rolle bei der Effektordiskriminierung (Takai et al, 2001). Ein GEF kann somit nicht nur eine spezifische GTPase aktivieren, sondern hat ebenso Einfluss auf den Effektor, der von der GTPase aktiviert wird. So kann durch den Austausch einer einzigen Aminosäure der RhoGTPasen Rac1 und Cdc42 aus *U. maydis* die GEF-Spezifität verändert werden. Während Rac1 von dem GEF Cdc24 und Cdc42 von dem GEF Don1 aktiviert wird, wird Rac1^{W56F} von Don1 und Cdc42^{F56W} von Cdc24 aktiviert. Dieser Austausch der GEF-Spezifität führt darüber hinaus dazu, dass Cdc42^{F56W} die *in vivo* Funktionen von Rac1 übernehmen kann. Dies zeigt, dass die Signalspezifität der GTPase auch durch den aktivierenden GEF bestimmt werden kann (Hlubek et al, 2008). Auch für RasGTPasen wurde berichtet, dass die Signalspezifität durch GEFs vermittelt wird. So werden in der Spaltheife *S. pombe* zwei RasGEFs, Efc25 und Ste6, jedoch nur ein Ras-Protein, Ras1, exprimiert. Efc25 determiniert die Signalspezifität von Ras1 während der Regulation der Zellpolarität, dem Spindelaufbau und der Chromosomensegregation, während Ste6 die Aktivität von Ras1 bei der Pheromonantwort reguliert (Papadaki et al, 2002). In dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* weisen RasGEFs eine strikte Spezifität gegenüber einer RasGTPase auf und aktivieren diese für eine spezifische Funktion (Kae et al, 2007). Beispielsweise ist der RasGEF AleA spezifisch für RasC und aktiviert RasC während der cAMP-Stimulation. Sowohl RasGEFA als auch RasC Mutanten sind nicht mehr in der Lage zu aggregieren (Kae et al, 2007).

In *U. maydis* wurden mit Sql2 und Tfh1 zwei RasGEFs identifiziert, die spezifisch den Nukleotidaustausch an Ras1 katalysieren. Der GEF Sql2 wurde als Ras1-spezifischer GEF identifiziert. Sql2 wurde dagegen als Ras2 GEF beschrieben (Müller et al, 2003). Diese Einordnung von Sql2 als Ras2-spezifischer GEF beruhte jedoch auf der

Beobachtung, dass sowohl die Überexpression von *sql2* als auch von *ras2* zu filamentösem Wachstum führt, während die Überexpression von *ras1^{Q67L}* keine morphologische Veränderung auslöst. Es stellte sich allerdings heraus, dass das verwendete *ras1*-Allel fehlerhaft war. Die Überexpression von Sql2 induziert die Expression von *mfa*. Ferner ist Sql2 nicht an der Regulation des cAMP-Signalwegs beteiligt. *sql2*-Deletionsmutanten sind darüber hinaus noch in der Lage zu kreuzen, jedoch in der Pathogenität beeinträchtigt (Müller et al, 2003). In den Untersuchungen für die hier vorliegende Arbeit konnte mittels *in vitro* GEF-Assays nachgewiesen werden, dass Sql2 ein Ras1 spezifischer GEF ist. Da Sql2 Ras1 aktiviert und Ras1 unter anderem die MAPK-Kaskade aktiviert, könnte Sql2 der GEF sein, der Ras1 zur Aktivierung der MAPK-Kaskade in seinen GTP-gebundenen Zustand überführt. Dies könnte eine Erklärung für die nicht nachzuweisende Aktivierung der MAPK-Kaskade nach einer Ras1 Überexpression sein. Sql2 könnte hierbei, entweder durch seine eigene Aktivierung oder durch seine Präsenz, einen limitierenden Faktor darstellen. Dies könnte erklären, dass eine Aktivierung der MAPK-Kaskade nur bei Überexpression des dominant aktiven Ras1 nachgewiesen werden konnte. Weitere Untersuchungen von Sql2 zeigten, dass die Überexpression von Sql2 zu einer Aktivierung von Rac1 führt, da das Cdc24-Protein nach Überexpression von *sql2* degradiert wird. Dies deutet darauf hin, dass Sql2 den Nukleotidaustausch an Ras1 und damit die Ras1 induzierte Aktivierung von Rac1 katalysieren kann. Dies könnten zwei voneinander unabhängige oder gekoppelte Vorgänge sein. Bei unabhängigen Vorgängen würde Sql2 zum einen Ras1 in seine GTP-gebundene Konformation überführen und Ras1GTP daraufhin die MAPKKK Kpp4 aktivieren. Zum andern würde Sql2 Ras1 für die Signalweiterleitung zu Rac1 aktivieren. Es ist jedoch auch vorstellbar, dass die Aktivierung der MAPK-Kaskade und des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Komplexes miteinander gekoppelt sind. Dies wäre der Fall, wenn der unter 2.7 postulierte Proteinkomplex aus Ras1, Kpp4, Ubc2 und Rac1 zustande käme. Hierfür würde Sql2 Ras1 aktivieren und Ras1 könnte daraufhin mit Kpp4 interagieren und somit aktivieren. Kpp4 interagiert mit Ubc2. Ubc2 interagiert daraufhin mit Rac1 und lokalisiert Rac1, eventuell samt Komplex an der Zellspitze. Dort wird dieser Proteinkomplex dann von dem Rac1GEF Cdc24 aktiviert und das polare Wachstum wird initiiert.

Während die Überexpression von Sql2 filamentöses Wachstum induziert, führt die Überexpression von Tfh1 zu einer veränderten Zellmorphologie und zum Zelltod. Da die Überexpressionen der beiden Ras1GEFs zu ungleichen Phänotypen führen, ist auch

in *U. maydis* zu vermuten, dass die GEFs die Signalweiterleitung über Ras1 entscheidend mit beeinflussen. Die deutlich voneinander zu unterscheidenden Phänotypen könnten auch durch unterschiedliche Lokalisationen der GEFs in der Zelle erklärt werden. In Kapitel 2.12.4 konnte gezeigt werden, dass das GFP-Fusionsprotein von Tfh1 an der Zytoplasmamembran und an Endomembranen lokalisiert. Tfh1 ist, wie auch Sql2, in der Lage über Ras1 das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul zu aktivieren. Demnach könnte Sql2 der GEF für die Ras1 induzierte Rac1 Aktivierung während der Filamentbildung sein. Tfh1 kontrolliert hingegen Ras1-Funktionen bei der Aktivierung von Rac1 an Endomembranen und der Zytoplasmamembran (siehe Abbildung 41). Überraschend und kaum zu interpretieren bleibt aber der letale Phänotyp der *tfh1*-Überexpression, da die Überexpression von *ras1^{G18V}* lebensfähig ist. Ale1, ein weiteres Protein, das eine RasGEF-Domäne enthält, ist ein AimlessA/RasGEFA Homolog. In *U. maydis* zeigt Ale1 in *in vitro* GEF-Assays eine strikte Spezifität gegenüber Ras2. Die Überexpression von Ale1 führt jedoch nicht zu filamentösem Wachstum. Eine konditionale *ale1*-Mutante, bei der die Expression von *ale1* unter Kontrolle des konditionalen *crg*-Promotors gebracht wurde, zeigt weder unter induzierenden noch unter reprimierenden Bedingungen eine sichtbare Veränderung (Wittkowski, 2007). Dies deutet darauf hin, dass Ale1 nicht für die Aktivierung von Ras2 während des filamentösen Wachstums zuständig ist. Demnach ist auch davon auszugehen, dass ein weiterer Ras2 aktivierender GEF existiert, der die Ras2 induzierte Filamentbildung reguliert. Hierfür kämen die noch nicht untersuchten RasGEF-Domänen enthaltenden Proteine Bem2 oder Lte1 in Frage. Interessanterweise enthält Bem2 neben den RasGEF-Domänen auch eine RhoGAP-Domäne. Die Überexpression von *bem2* führt zur Ausbildung von hyperpolarem Wachstum, das sich jedoch deutlich von den Ras2 induzierten Filamenten unterscheidet. Bem2 lokalisiert an der gesamten Zytoplasmamembran (nicht gezeigte Ergebnisse). Darüber hinaus wurde ein konditionaler *bem2*-Stamm konstruiert. Unter induzierenden Bedingungen konnte eine Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmoduls gezeigt werden (nicht gezeigte Ergebnisse in Zusammenarbeit mit S. Frieser). Die Überexpression der RhoGAP-Domäne von Bem2 in einem *cdc24*-überexprimierenden Stamm, ist jedoch ausreichend, um filamentöses Wachstum zu induzieren (S. Frieser, persönliche Mitteilung). Von daher erscheint es wenig wahrscheinlich, dass die Regulation des polaren Wachstums durch die RasGEF-Domäne von Bem2 vermittelt wird.

Lte1 wurde bisher in *U. maydis* noch nicht untersucht. In *S. cerevisiae* zeigt Lte1 keine GEF Aktivität gegenüber RasGTPasen, ist jedoch für die Lokalisierung von Ras2 am Cortex der Knospe und für die Lokalisierung von Bfa1 am Spindelpolkkörper zuständig (Jensen et al, 2002).

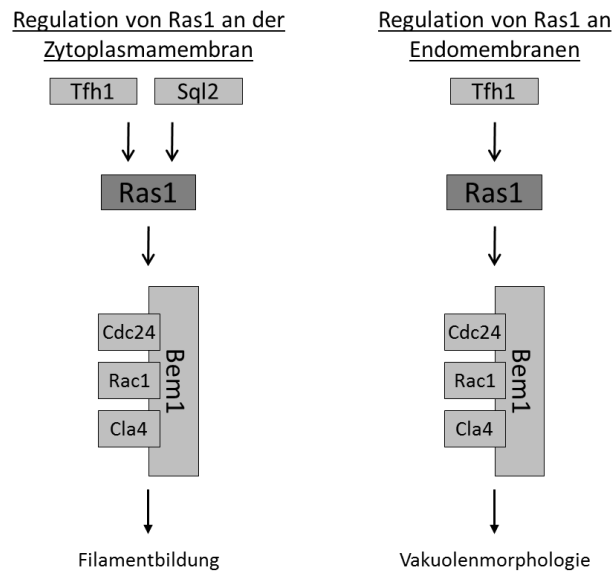


Abbildung 41: Modell zur Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem2-Signalmoduls durch Ras1

In diesem Modell wird Ras1 durch Sql2 und/oder Tfh1 an der Zellspitze aktiviert. Daraufhin aktiviert Ras1 das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem2-Signalmodul und das polarisierte, filamentöse Wachstum wird induziert. Darüber hinaus wird Ras1 von Tfh1 an Endomembranen aktiviert, um dort das Rac1-Signalmodul zur Regulation der Vakuolenmorphologie zu aktivieren.

3.4 Ausblick

Das filamentöse Wachstum, das in vielen Pilzen nach einer morphologischen Transition während Kreuzungsvorgängen oder als Reaktion auf Nährstoffquellen zu beobachten ist, wird über konservierte Signalwege reguliert. In verschiedenen Pilzen sind RasGTPasen, RhoGTPasen, MAPK-Kaskaden und oder der cAMP-Signalweg an der Signalweiterleitung, die zu filamentösem Wachstum führt, von entscheidender Bedeutung (Bluhm et al, 2007; Takai et al, 2001; Weeks & Spiegelman, 2003). Auch an der Regulation des dimorphen Wechsels von *U. maydis* von knospenden Sporidien zu filamentösen Hyphen ist unter anderem die Pheromon aktivierte MAPK-Kaskade und der cAMP-Signalweg beteiligt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die kleine

GTPase Ras1 eine zentrale Rolle beim filamentösen Wachstum spielt. Es konnte nach Expression von Ras1^{G18V} sowohl eine Aktivierung der MAPK-Kaskade und des cAMP-Signalwegs als auch eine Interaktion zwischen Ras1 und den beiden Effektoren Kpp4 und Uac1 nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Ras1 während der Filamentinduktion das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul aktiviert (siehe Abbildung 42). Ras1 könnte man demzufolge als zentralen Koordinator dieser Signalwege verstehen. Das postulierte Signalmodul aus Ras1, der MAPK-Kaskade und Rac1 scheint die Organisation des Zytoskeletts mit der für filamentöses Wachstum notwendigen Genregulation zu verknüpfen. Ras1 wird in diesem Fall wahrscheinlich durch den GEF Scl2 aktiviert. Darüber hinaus ist für das über Ras1 induzierte filamentöse Wachstum die Lokalisation von Ras1 an der Zytoplasmamembran unabdingbar. Die intrazelluläre Positionierung von Ras1 wird durch ein C-terminales Palmitoylierungssignal reguliert. Wird dieses mutiert, lokalisiert Ras1 an Endomembranen und nicht mehr an der Zytoplasmamembran. Von Endomembranen aus kann Ras1 seine essentiellen Funktionen erfüllen.

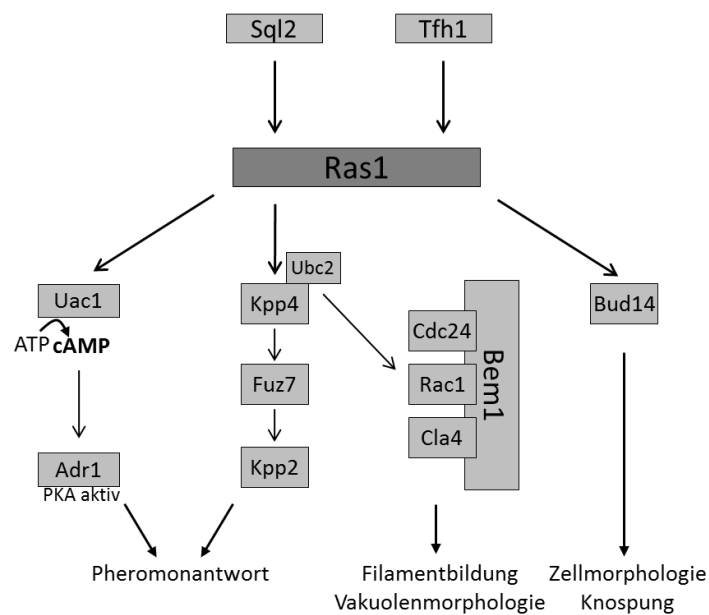


Abbildung 42: Modell der Ras1 regulierten Signalwege

Diese Abbildung zeigt schematisch die unterschiedlichen von Ras1 regulierten Signalwege in *U. maydis*. Es wird deutlich, dass die MAPK-Kaskade und der cAMP-Signalweg beide die Pheromonantwort regulieren. Das Rac1-Signalmodul ist für die Zellmorphologie verantwortlich und reguliert insbesondere Hyphenwachstum und Vakuolen, während Bud14 an der Regulation der Knospung beteiligt ist.

Dass RasGTPasen sowohl den cAMP-Signalweg als auch die MAPK-Kaskade aktivieren, wurde bereits in *S. cerevisiae* gezeigt. Diploide Zellen wechseln unter Stickstoffmangel-Bedingungen ihre Zellmorphologie von knospenden Zellen zu Pseudohyphen. Hierfür wird sowohl die MAPK-Kaskade als auch der cAMP-Signalweg über eine Aktivierung durch Ras2 reguliert. Zum einen wird unter Stickstoffmangel-Bedingungen über Ras2 Cdc42 und dessen Effektor Ste20 aktiviert. Das Signal wird über die MAPK-Kaskade, bestehend aus Ste11, Ste7 und Kss1, an den Transkriptionsfaktor Ste12 weitergeleitet (Mösch et al, 1996). Zum anderen wird Ras2 durch das G α -Protein Gpa2 aktiviert. Ras2 leitet dieses Signal an die Adenylatzyklase CYR1 weiter. Auch in haploiden *S. cerevisiae* Zellen aktiviert Ras während des invasiven Wachstums den cAMP-Signalwegs und der MAPK-Kaskade. Das invasive Wachstum unterscheidet sich vom Pseudohyphenwachstum unter anderem darin, dass die Filamente auch in stickstoffreichen Agar eindringen (Roberts & Fink, 1994).

Insgesamt zeigen die Daten dieser Arbeit, dass für die morphologische Transition des pathogenen Pilzes *U. maydis* ein komplexes Instrumentarium von Signalproteinen benötigt wird. *U. maydis* scheint das Hyphenwachstum in ähnlicher Weise zu koordinieren wie die Bäckerhefe. In diesem Orchester ist Ras1 eine Art Dirigent und stimmt die unterschiedlichen Wege aufeinander ab.

4 Material

4.1 Allgemeine Materialien und Bezugsquellen

4.1.1 *U. maydis*-Stämme

Tab. 4.1: Verwendete *U. maydis*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Kernphase	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	haploid	(Banuett and Herskowitz, 1989)
Bub8	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung
Ras1_{kond}	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (M. Mahlert)
Bub8GFPras1	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (M. Mahlert)
Bub8Δrac1	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (M. Mahlert)
FB1Δcdc42	<i>a1 b1</i>	haploid	Laborsammlung (M. Mahlert)
Bub8cdc24GFP	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (S. Frieser)
Bub8Δrac1cdc24GFP	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (S. Frieser)
Bub8cdc24GFPras1	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (A. Heskamp)
Bub8cdc24GFPras1QLa	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (A. Heskamp)
Bub8cdc24GFPras1SS	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (A. Heskamp)
Bub8Δrac1cdc24GFPras1	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (A. Heskamp)
Bub8cdc24HA	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (S. Frieser)
Bub8abpYFP	<i>a2 b4</i>	haploid	Laborsammlung (K. Schink)
AB31	<i>a2 pcrg::bW2/bE1</i>	haploid	(Brachmann et al., 2001)
AB33	<i>a2 pnar::bW2/bE1</i>	haploid	(Brachmann et al., 2001)
SG200	<i>a1::mfa2 bW2 bE1</i>	haploid	(Bölker et al., 1995)
FB1Δkpp4	<i>a1 b1</i>	haploid	(Müller et al., 2003b)
FB1Δfuz7	<i>a1 b1</i>	haploid	(Müller et al., 2003b)
FB1Δuac1	<i>a1 b1</i>	haploid	(Gold et al., 1994)
FB1fuz7DDkond	<i>a1 b1</i>	haploid	(Müller et al., 2003b)
FB1Δubc1	<i>a1 b1</i>	haploid	(Gold et al., 1994)

Tab. 4.1: Hergestellte *U. maydis*-Stämme.

Stamm	Ausgangsstamm	genutzte Plasmide
Bub8-P _{etef} :: <i>ras1</i>	Bub8	pEtef- <i>ras1</i>
Bub8-P _{crg} :: <i>ras1</i> ^{G18V} (1x)	Bub8	pRU11- <i>ras1</i> ^{G18V} (einzel Int.)
Bub8-P _{crg} :: <i>ras1</i> ^{G18V} (x)	Bub8	pRU11- <i>ras1</i> ^{G18V} (mehrf.Int.)
Bub8-P _{crg} :: <i>ras1</i> ^{G18VCCSS}	Bub8	pRU11- <i>ras1</i> ^{G18VCCSS}
Bub8-P _{crg} :: <i>ras1</i> ^{CCSS}	Bub8	pRU11- <i>ras1</i> ^{CCSS}
Bub8-P _{crg} :: <i>gfp-ras1</i> ^{CCSS}	Bub8	pCrg-GFP _{ras1^{CCSS}}
Bub8Kpp4-GFP	Bub8	pKpp4GFP
Bub8Uac1-HA	Bub8	pUac1HA
Bub8Ubc2-GFP	Bub8	pCrg-ubc2GFP
Bub8-P _{etef} :: <i>ras1</i> ^{CCSS}	Bub8	pEtef- <i>ras1</i> ^{CCSS}
Bub8-P _{etef} :: <i>ras1</i> ^{G18VCCSS}	Bub8	pEtef- <i>ras1</i> ^{G18VCCSS}
Bub8-P _{etef} :: <i>gfp-ras1</i> ^{CCSS}	Bub8	pEtef-GFP _{ras1^{CCSS}}
Bub8-P _{etef} :: <i>gfp-ras1</i> ^{G18VCCSS}	Bub8	pEtef-GFP _{ras1^{G18VCCSS}}
FB1Δkpp4-P _{crg} :: <i>ras1</i> ^{G18V}	FB1Δkpp4	pRU11- <i>ras1</i> ^{G18V}
FB1Δkpp4-P _{crg} :: <i>ras1</i>	FB1Δkpp4	pRU11- <i>ras1</i>
FB1Δkpp4-P _{crg} :: <i>rac1</i>	FB1Δkpp4	pRU11- <i>rac1</i>
FB1Δfuz7-P _{crg} :: <i>ras1</i>	FB1Δfuz7	pRU11- <i>ras1</i>
FB1Δfuz7-P _{crg} :: <i>rac1</i>	FB1Δfuz7	pRU11- <i>rac1</i>
Ras1 _{kond} P _{etef} :: <i>abp-yfp</i>	Ras1 _{kond}	p123-abpYFP
Ras1 _{kond} P _{etef} :: <i>tub1-rfp</i>	Ras1 _{kond}	p123-tub1RFP
Ras1 _{kond} -P _{etef} :: <i>ras1</i> ^{CCSS}	Ras1 _{kond}	pEtef- <i>ras1</i> ^{CCSS}
Ras1 _{kond} -P _{etef} :: <i>ras1</i>	Ras1 _{kond}	pEtef- <i>ras1</i>
Ras1 ^{CCSSend}	Bub8	pRas1 ^{CCSSendogen}
Ras1 ^{CCSSend} -P _{crg} :: <i>ras1</i>	Ras1 ^{CCSSend}	pRU11- <i>ras1</i>
Ras1 ^{CCSSend} -P _{crg} :: <i>ras1GFP</i>	Ras1 ^{CCSSend}	pCrg-GFP _{ras1}
Ras1 ^{CCSSend} -P _{crg} :: <i>rac1</i>	Ras1 ^{CCSSend}	pRU11- <i>rac1</i>
Ras1 ^{CCSSend} -P _{crg} :: <i>rac1</i> ^{Q61L}	Ras1 ^{CCSSend}	pRU11- <i>rac1</i> ^{Q61L}
Ras1 ^{CCSSend} P _{etef} :: <i>tub1-rfp</i>	Ras1 ^{CCSSend}	p123-tub1RFP
Ras1 ^{CCSSend} P _{etef} :: <i>abp-yfp</i>	Ras1 ^{CCSSend}	p123-abpYFP
AB31-Ras1 ^{CCSSend}	AB31	pRas1 ^{CCSSendogen}
AB33-Ras1 ^{CCSSend}	AB33	pRas1 ^{CCSSendogen}

Bub8- Δ ubc2- $P_{etef}::cdc24$ -gfp-		
$P_{crg}::ras1^{G18V}$	Bub8cdc24GFP $ras1^{G18V}$	pUbc2 Δ Hyg
Bub8- Δ rac1- $P_{etef}::cdc24$ -gfp-		
$P_{crg}::ras1^{G18V}$	Bub8cdc24GFP Δ rac1	pRU11- $ras1^{G18V}$
Bub8- $P_{etef}::cdc24$ -gfp- $P_{crg}::tfh1$	Bub8cdc24GFP	pCrg-GFP $tfh1$
Bub8- $P_{etef}::cdc24$ -gfp- $P_{crg}::sql2$	Bub8cdc24GFP	pCrg-GFP $sql2$

4.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

Für Klonierungen von DNA wurde entweder der Stamm DH5_ (Hanahan, 1983) oder der Stamm Top10 (Invitrogen) verwendet.

Stamm	Genotyp
DH5α	F ⁻ , endA1, hsdR17(rK ⁻ , mK ⁺), supE44, thi-1, gyrA96(Nal ^r), relA1, recA1, _(argF-lacIZYA)U169(_80dlacZ_M15)
Top10	F ⁻ mcrA _(mrr-hsdRMS-mcrBC) _80lacZ_M15 _lacX74 recA1 araD139 _(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^r) endA1 nupG
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) gal dcm_(DE3)
BL21(DE3) pLysS	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) gal dcm_(DE3) pLysS (Cam ^r)
BL21-	B F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal_(DE3) endA Hte[argU
CodonPlus(DE3)-	ileY leuW Cam ^r]
RIL (Codon+)	
BL21(DE3)	B F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal_(DE3) endA Hte[argU
Codon2+	ileX Spec ^r]
BL21-	B F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal_(DE3) endA Hte[argU
CodonPlus(DE3)-	proL Cam ^r]
RP (Codon 3+)	
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) gal dcm_(DE3) pLysSRARE (Cam ^r)
Rosetta pLysS	
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) gal dcm_(DE3) pRARE2(Cam ^r)
Rosetta2	
ArcticExpress(DE3)	F ⁻ ompT hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal_(DE3) endA Hte [cpn10cpn60 Gent ^r]

4.1.3 Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DF5 his1-1	MATa; his3-D200, leu2-3,2-112, lys2-801, trp1-1(am), ura3-52, his1-1	Derivat von DF5 (Finley et al., 1987)

4.1.4 Chemikalien

Tab. 4.2: Verwendete Chemikalien.

Name	Bezugsquelle
α -32P-dATP	Hartmann Analytic (Braunschweig)
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Agarose medium	EEO Biomol (Hamburg)
Ammoniumnitrat	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Aminobenzoessäure	Sigma (Deisenhofen)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
APS	Roth (Karlsruhe)
Bacto-Agar	Difco (Detroit)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Carboxin	Riedel-de Haen (Seelze)
Casaminoacids	Difco (Detroit)
Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Cholinchlorid	Sigma (Deisenhofen)
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Roth (Karlsruhe)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth (Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
DNA degr. Free Acid	Sigma (Deisenhofen)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Eisen(III)Chlorid	Roth (Karlsruhe)

Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (vergällt)	Schmidt-GmbH (Dillenburg)
Ethanol (unvergällt)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
FM4-64 – Farbstoff	Molecular Probes (Leiden, NL)
Glukose	Roth (Karlsruhe)
L-Glutamin	Sigma (Deisenhofen)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
H ₂ O	Braun (Melsungen)
Hefeextrakt	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)
HygromycinB	Duchefa (Haarlem, NL)
Myo-Inositol	Sigma (Deisenhofen)
IPTG	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumnitrat	Roth (Karlsruhe)
Kupfersulfat	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid	Mallinckrodt Baker BV (Deventer, NL)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriummolybdat	Merck (Darmstadt)
Nicotinsäure	Sigma (Deisenhofen)
Nourseothricin	Werner Bioagents (Jena)
Orange G	Sigma (Deisenhofen)
Ca-Pantothenat	Sigma (Deisenhofen)
Paraffinöl	Merck (Darmstadt)
Pepton	Difco (Detroit, US)

Phenol	Roth (Karlsruhe)
Polyethylenglycol (PEG 4000)	Merck (Darmstadt)
Potato-Dextrose	Difco (Detroit, US)
Proteinase K	Sigma (Deisenhofen)
Pyridoxin	Sigma (Deisenhofen)
Riboflavin	Sigma (Deisenhofen)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Sequagel™ XR	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Sorbitol	Sigma (Deisenhofen)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Thiamin	Sigma (Deisenhofen)
Tris	Roth (Karlsruhe)
TritonX-100	Sigma (Deisenhofen)
Trypton	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)
X-Gal	Roth (Karlsruhe)
Zinkchlorid	Merck (Darmstadt)

4.1.5 Kits

Tab. 4.3: Verwendete Kits.

Name	Bezugsquelle
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
JETSORB'g'Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
Maxi-Kit Jetstar 2.0	Genomed (Bad Oeynhausen)
Megaprime Labeling Kit	Amersham (Braunschweig)
peqGOLD Plasmid Mini Prep Kit I	peqLAB (Erlangen)
Gel Extraction Kit	AVEGene (Hilden)
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Mannheim)

4.1.6 Enzyme und Proteine

Tab. 4.4: Verwendete Enzyme und Proteine.

Name	Bezugsquelle
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Amersham (Braunschweig)
Lysozym	Boehringer (Mannheim)
Novozym 234 Novo	Nordisc (Kopenhagen, DN)
Pfx DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Amersham (Braunschweig); New England Biolabs GmbH (Schwalbach)
RNase A	Serva (Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	Boehringer (Mannheim)
Taq-Polymerase	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)

4.1.7 Sonstige Materialien

Tab. 4.5: Sonstige Materialien.

Material	Bezugsquelle
BIODYNE B - Membran (0,45 µm)	Pall (Dreieich)
Blottingpapier	Macherey-Nagel (Düren)
Elektroporationsküvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Falcon-Röhrchen (15ml und 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Faltenfilter	Schleicher und Schuell (Dassel)
Glasperlen	Sigma (Deisenhofen)
Kunststoff-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Mais-Samen	Olds Seed Solutions (Madison, US)
MobiSpin Columns	MoBiTec (Göttingen)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Greiner (Frickenhausen)
Röntgenfilm CEA RP New medical X-RayFilm	CEA AB (Strängnäs, Schweden)
Schikanekolben	Ochs (Bovenden)
sterile Spritzen und Kanülen	Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Sarstedt (Nümbrecht)
Storage Phosphor Screen	Amersham (Freiburg)

4.1.8 Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben, sind alle Puffer und Lösungen mit H₂O bidest. angesetzt.

AE-Puffer (RNA-Präparation)	50 mM Na-Acetat, pH 5,3 10 mM Na ₂ -EDTA
Ampicillin-Lösung	10 mg/ml Ampicillin
Carboxin-Lösung	2 mg/ml Carboxin in Methanol
CCMB80-Puffer	10 mM KOAc pH 7,0 80 mM CaCl ₂ 20 mM MnCl ₂ 10 mM MgCl ₂ 10 % Glycerin Mit 0,1 M HCl auf pH 6,4 einstellen
DNA-Auftragspuffer (10x)	0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF 0,2 % (w/v) Orange G 50 % (w/v) Saccharose 1 mM Na ₂ -EDTA
dNTP-Lösung	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
Inoue Transformations-Puffer	10 mM Pipes pH 6,7 55 mM MnCl 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl
Inoue Transformationspuffer mit Glycerin	10 mM Pipes pH 6,7 55 mM MnCl 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl 15% Glycerin

Lysis-Puffer	2,0 % (w/v) Triton X-100
(DNA-Präparation aus <i>U. maydis</i>)	1 % (w/v) SDS
	100 mM NaCl
	10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0
	1 mM Na ₂ -EDTA
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym
	10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0
MOPS-Puffer (10 x)	200 mM MOPS, pH 7,0
	80 mM Na-Acetat
	10 mM Na ₂ -EDTA
Northern-Hybridisierungspuffer	50 mM PIPES, pH 6,5
	100 mM NaCl
	50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0
	1 mM EDTA
	5 % (w/v) SDS
Northern-Waschpuffer	1 x SSC
	5 % SDS
Northern-Strip-Puffer	0,1 x SSC
	0,1 % SDS
PCR-Puffer (<i>Taq</i> DNA-Polymerase)	10 mM Tris/HCl, pH 8,3
	50 mM KCl
	1,5 mM MgCl ₂
Phenol/AE	50 % (v/v) Phenol
	50 % (v/v) AE-Puffer
Phenol/Chloroform	50 % (v/v) Phenol
	50 % (v/v) Chloroform
RNA-Auftragspuffer	50 % (w/v) Saccharose
	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	0,25 % (w/v) Xylencyanol FF
	in MOPS-Puffer

Salzlösung nach Holliday (sterilfiltriert)	16,0 ‰ (w/v) KH_2PO_4 4,0 ‰ (w/v) Na_2SO_4 8,0 ‰ (w/v) KCl 4,08 ‰ (w/v) MgSO_4 1,32 ‰ (w/v) CaCl_2 8,0 ‰ (v/v) Spurenelement-Lösung
SCS-Puffer (Protoplastierung)	20 mM Natriumcitrat-Puffer pH 5,8 1 M Sorbitol
SCS-Novozym-Lösung (Protoplastierung)	0,5 % (w/v) Novozym 234(sterilfiltriert) in SCS-Lösung
Sol A (Plasmidpräparation)	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 10 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 100 µg/ml RNase A
Sol B (Plasmidpräparation)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Sol C (Plasmidpräparation)	5 M Kalium-Acetat 2 M Essigsäure
STET-Puffer	50 mM EDTA 50 mM Tris/HCl pH8 8 % (w/v) Saccharose 5 % (v/v) Triton X 100 2 M Essigsäure
Southern-Denaturierungslösung	0,25 M HCl
Southern-Transferlösung	0,4 M NaOH
Southern-Hybridisierungspuffer	7 % (w/v) SDS 500 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0
Southern-Waschpuffer	1 % (w/v) SDS 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0
Spurenelement-Lösung (sterilfiltriert)	0,06 ‰ (w/v) H_3BO_3 0,14 ‰ (w/v) MnCl 0,4 ‰ (w/v) ZnCl_2 0,4 ‰ (w/v) Na_2MoO_4

	0,1 ‰ (w/v) FeCl ₃
	0,04 ‰ (w/v) CuSO ₄
SSC (20 x)	300 mM Na-Citrat, pH 7,0
	3 M NaCl
STC-Puffer (Protoplastierung)	1 M Sorbitol
	10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5
	100 mM CaCl ₂
STC/PEG (Transformation <i>U. maydis</i>)	60 % (v/v) STC-Puffer
	40 % (w/v) Polyethylenglykol
TAE-Puffer	40 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,3
	20 mM Na-Acetat
	2 mM Na ₂ -EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0
	1 mM Na ₂ -EDTA
TE mit RNaseA	50 µg/ml RNaseA
	in TE-Puffer
Vitaminlösung nach Holliday	0,1 ‰ (w/v) Thiamin
	0,05 ‰ (w/v) Riboflavin
	0,05 ‰ (w/v) Pyridoxin
	0,2 ‰ (w/v) Ca-Pantothenat
	0,05 ‰ (w/v) Aminobenzoesäure
	0,2 ‰ (w/v) Nicotinsäure
	0,2 ‰ (w/v) Cholinchlorid
	1,0 ‰ (w/v) myo-Inositol
X-Gal-Lösung	2,0 % (w/v) X-Gal
	in N, N-Dimethylformamid

4.1.9 Puffer für die Aufreinigung von Proteinen

Alle Puffer wurden mit H₂O_{bidest} angesetzt und vor der Verwendung entgast.

GTPase-Lysepuffer	50 mM Tris pH 7,5
	100 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	5 mM DTT

GTPase-Elutionspuffer	50 mM Tris pH 8.0
	150 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM reduziertes Glutathion
	5 mM DTT
GTPase-Dialysepuffer	20 mM Tris pH 8.0
	50 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM Glyzerin
	5 mM DTT
GEF-Assaypuffer	20 mM Tris pH 8.0
	50 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM Glyzerin
	5 mM DTT
	50 µg/ml BSA
	400 nM mantGTP

4.1.10 Medien zur Kultivierung von *U. maydis*

Bezeichnung	Lösung in H ₂ O dest.
Complete Medium (CM)	0,25 % (w/v) Casaminoacids
	0,1 % (w/v) Yeast-Extract
	1,0 % (v/v) Vitaminlösung nach Holliday
	0,05 % (w/v) DNA degr. Free Acid
	6,25 % (v/v) Salzlösung nach Holliday
	0,15 % (w/v) Ammoniumnitrat
	1,0 % (w/v) Glukose bzw. Arabinose
MM-Glutamin-Medium	4,38 g/l L-Glutamin
	1 % (w/v) Glukose bzw. Arabinose
	6,25 % (v/v) Salzlösung nach Holliday
NSY-Glycerin-Medium	8 g/l Nutrient Broth
	5 g/l Saccharose
	1 g/l Hefe-Extrakt
	69,6 % (v/v) Glycerin

PD- Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth 2,0 % (w/v) Agar
PD-Charcoal-Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth 10 g/l Charcoal 2,0 % (w/v) Agar
Regenerations-Agar	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) C-Quelle 182,2 g/l Sorbitol 1,5 % (w/v) Agar
YEPA-Agar	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) Agar 2,0 % (w/v) Arabinose
YEPD-Agar	wie YEPA-Agar jedoch 2,0 % (w/v) Glukose als C-Quelle
YEPS-Medium	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2,0 % (w/v) Saccharose
Wasseragar	2,0 % (w/v) Agar
YNBA-Medium	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base 0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat 4,0 % (v/v) Arabinose-StammlSG. (50,0 % (w/v))
YNB-G-Medium	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base 0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat 4,0 % (v/v) Glukose-Stammlösung (50,0 % (w/v))
YNB-Regenerations-Agar	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base 0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat 2,0 % (w/v) Glukose bzw. Arabinose 182,2 g/l Sorbitol 1,5 % (w/v) Agar

4.1.11 Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*

Bezeichnung	Lösung in H₂O dest.
YEPD-Medium	10 g/l Hefe-Extrakt 20 g/l Pepton 2% Glucose
YEPD-Agar	YEPD-Medium 20 g/l Agar
Hefe-Selektionsmedium	1,7 g/l YNB 5 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,81 g/l Aminosäuremix 2% Glucose Nach Selektions-Bedarf: 0,1 g/l Histidin 0,2 g/l Leucin 0,1 g/l Uracil 0,1 g/l Tryptophan 0,025 g/l Adenin pH-Wert auf 5,6 – 5,8 einstellen
Aminosäuremix	2g Alanin 2g Argini 2g Asparagin 2g Asparaginsäure 2g Cystein 2g Glutamin 2g Glutaminsäure 2g Glycin 2g Inositol 2g Isoleucin 2g Lysin 0,2g para-Aminbenzoesäure 2g Phenylalanin 2g Prolin 2g Serin 2g Threonin

	2g Tyrosin
	2g Valin
Hefe-Selektionsagar	Hefe-Selektionsmedium
	20 g/l Agar

4.1.12 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Bezeichnung	Lösung in H ₂ O dest.
dYT-Medium	16 g/l Trypton
	10 g/l Hefe-Extrakt
	5 g/l NaCl
dYT-Agar	wie dYT-Medium
	1,3 % (w/v) Agar
dYT-Glycerin-Medium	wie dYT-Medium
	69,6 % (v/v) Glycerin

4.1.13 Nukleinsäuren

4.1.13.1 In dieser Arbeit verwendete Plasmide:

Name	Resistenz	Herkunft
P123-Nterminal-GFP	Amp, Cbx	Laborsammlung
pBS-hhn	Amp	Jörg Kämper, persönliche Mitteilung
pCdc42ΔHyg	Amp	Laborsammlung (Mahlert, 2002)
pCR2.1-Topo	Amp	Invitrogen (Topo TA Cloning Kit)
pCrg-GFP-Ala6-MXN	Amp, Cbx	Laborsammlung
pGonc-cbx-eGFP-NLS	Amp, Cbx	Gero Steinberg, (Straube et al., 2001)
pMF2-1H	Amp, Hyg	Laborsammlung (Brachmann et al., 2004)
pNEB-UN	Amp, NAT	Laborsammlung
pRU11	Amp, Cbx	Laborsammlung
pRU11ΔNotI	Amp, Cbx	Laborsammlung
pSL1180	Amp	Amersham Klonierungsvektor
pJet1.2	Amp	Fermentas
pGEX4T-1	Amp	GE Healthcare
pGST	Amp	Laborsammlung
pTZ18R	Amp	Laborsammlung

ME427 <i>ubc2</i> 5'LF:	aacgccagggttttcccagtcacgacgaatATTAAAGCCCGCCGTGC ACGCTGCATTTG
ME428 <i>ubc2</i> 3'LF:	attgtcacgccatggtggccatctaggccGGTTGGCGGAAGAGGCTGAG AATCAGGGAAG
ME431 <i>ubc2</i> 5'RF:	gtgcggccgcattaataggcctgagtggccTCTCGACGTGCCTCAGG TGACGTCCGCCC
ME432 <i>ubc2</i> 3'RF:	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatATTCACGATTACATCC GCGTTTGTGGTTC

pCrg-Ubc2GFP

Enthält den *ubc2* ORF, einkloniert in die MluI- und die NotI-Schnittstelle von pCrg-GFP-Ala6-MXN. Der *ubc2* ORF wurde unter Verwendung der unten genannten Primer amplifiziert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Plasmid mit SspI linearisiert.

ME424 *ubc2* 5'MluI gtcgcACGCGTGATGTCCTCTCAAAGCCCAAAG

ME426 *ubc2* 3'NotI cggatgcggccgcTCAGACGGTAGCCATCGG

pCrg-GFPras1^{CCSS}

Enthält das *ras1*^{C207SC208S}-Allel, einkloniert in die MluI- und die NotI-Schnittstelle von pCrg-GFP-Ala6-MXN. Das *ras1*^{CCSS}-Allel wurde unter Verwendung der unten genannten Primer amplifiziert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Plasmid mit SspI linearisiert.

MC893 Ras1 5'NdeI gaattcatATGTCCAAAGCACAATTCTTGCGAG

MD513 Ras13'SS NotI tgcgcggccgcttagagaacgatacatttctgactcgagcccgccgaatgagaccc

pCrg-GFPras1^{G18VCCSS}

Enthält *ras1*^{G18VCCSS}-Allel, einkloniert in die MluI- und die NotI-Schnittstelle von pCrg-GFP-Ala6-MXN. Das *ras1*^{G18VCCSS}-Allel wurde unter Verwendung der Primer MC943 und MD513 von pCrg-ras1^{G18V} amplifiziert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Plasmid mit SspI linearisiert.

pRU11-ras1^{CCSS}

Enthält das *ras1*^{CCSS}-Allel, einkloniert in die NdeI- und die NotI-Schnittstelle von pRU11-ΔNotI. Das *ras1*^{CCSS}-Allel wurde unter Verwendung der Primer MC893 und MD513 amplifiziert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Plasmid mit SspI linearisiert.

pRU11-ras1^{G18VCCSS} (Amp, Cbx) Enthält *ras1^{G18VCCSS}*-Allel, einkloniert in die NdeI- und die NotI-Schnittstelle von pRU11. Das *ras1^{G18VCCSS}*-Allel wurde unter Verwendung der Primer MC943 und MD513 von pCrg-Ras1^{G18V} amplifiziert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Plasmid mit SspI linearisiert

pRas1^{CCSSendogen}

Mit diesem Konstrukt wurde eine endogene C207SC208S-Mutation im *ras1*-Orf erzeugt. Es wurde durch *drag & drop* mit den unten genannten Primern und der Hyg-Kassette aus pMF1-H kloniert. Vor der Transformation in *U. maydis* wurde es mit SspI linearisiert.

ME918 r1ss 5'end neu	GGAAGGGTCTCATTCGGCGGGctcgagtCAGAAATGTATCGTT CTCTAAcagtgtgcatc
ME919 r1ss 3'end neu	gatgcacactgTTAGAGAACGATACATTTCTGactcgagCCCGCCGAA TGAGACCCTTCC
ME561 5'RF r1end	gtgcggccgcattaataggcctgagtggccCCTTGACTGTGCAC TCTGTGACTGTGACTG
ME602 3'RF r1end	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatATTTTCGTCGCGT TCGGATCGGATGCGTTG

pKpp4GFP

Mit diesem Konstrukt wurde eine endogene Kpp4GFP-Fusion erzeugt. Es wurde durch *drag & drop* mit den unten genannten Primern und der GFP-NAT-Kassette aus pMF5-1N kloniert. Vor der Transformation in *U. maydis* wurde es mit SspI linearisiert.

ME238 5'LF Kpp4GFP:	gtaacgccagggttttccagtcacgacgaatATTTTGGTTCGACAACAA GGGAGGTATC
ME239 3'LF kpp4GFP:	CTTGCTCACcatGGTggccgcgttggcCgcAGAATCCGCCTCTTCGCTG AACGCTGCG
ME146 5'RF dkpp4:	gtgcggccgcattaataggcctgagtggccACTGCACCTCACAAGCAATT TGCGAAGC
ME147 3'RF dkpp4:	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatATTGGGCGCACAATTGCCC GTGAAAGC

pUac1GFP

Mit diesem Konstrukt wurde eine endogene Uac1GFP-Fusion erzeugt. Es wurde durch *drag & drop* mit den unten genannten Primern und der GFP-NAT-Kassette aus pMF5-1N kloniert. Vor der Transformation in *U. maydis* wurde es mit SspI linearisiert.

ME236 5'LF uac1GFP	gtaacgccagggttttcccagtcacgacgaatATTCAGTGGGGACGGCC AGTGTGTGAG
ME237 3'LF uac1GFP	CTTGCTCACcatGGTggccgcgttggcCgcGGGAACCAGCTCCAACA GCCTGTTGCGAG
ME142 5'RF duac1	gtgcggccgcattaataggcctgagtggcGCGCGGCGCCTGG TGGTTGTTTCGAAATAG
ME143 3'RF duac1	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatATTCAGCTTCC AGCCTGTCTCGTTTAC

pCrg-Tfh1GFP

Enthält den *tfh1*-Orf, einkloniert in die MluI- und die NotI-Schnittstelle von pCrg-GFP-Ala6-MXN. Der *tfh1*-Orf wurde unter Verwendung der unten genannten Primer amplifiziert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Plasmid mit SspI linearisiert.

ME231 5'Mlu cdc25	gtcgCACGCGTGATGACCTCGACTTCTGCTG
ME234 3'Not cdc25	cggatgcggccgcCTACAAAAATCCACTCTCC

pCrg-Sql2GFP

Enthält den *sql2*-Orf, einkloniert in den Vektor pCrg-GFP-Ala6-MXN kloniert. Der *sql2*-Orf wurde unter Verwendung der unten genannten Primer amplifiziert. Zur Transformation von *U. maydis* wurde das Plasmid mit SspI linearisiert.

MF244 5'sql2 asc1	gtcgcGGCGCGCCatggcctcgtctgcatcggc
ME771 3'sql2 bsrGI	GTGTGGGTGtgtacaTGGCCG

pGEX-Sql2-GEF-N

Enthält die RasGEF-Domäne und das N-terminale Motiv von Sql2. Die Domänen wurden mit den unten aufgeführten Primern amplifiziert und in den pGEX4T-1 ligiert.

MD611 sql2 3'GEF	tatcgcgccgcCTATCCGGCCTTGTCGGT
MD612 sql2 5'GEF	gatacatatgTCGACCTACAGGGAACAA

pGEX-Ale1-GEF-N

Enthält die RasGEF-Domäne und das N-terminale Motiv von Ale1. Die Domänen wurden mit den unten aufgeführten Primern amplifiziert und in den pGEX4T-1 ligiert.

MD607 aleA 5'GEF gatacatatgCCAAGCTTCCAGTCCGAC

MD608 aleA 3'GEF tatcgcgccgcTCAAGCATGCGAAGAGGC

pGEX-Tfh1-GEF-N

Enthält die RasGEF-Domäne und das N-terminale Motiv von Tfh1. Die Domänen wurden mit den unten aufgeführten Primern amplifiziert und in den pGEX4T-1 ligiert.

MD609 sql2rel 5'GEF gatacatatgCCGTGGTTCCTCGAGCC

MD610 sql2rel 3'GEF tatcgcgccgcCTACAAAATCCACTCTC

pGEX-Bem2-GEF-N

Enthält die RasGEF-Domäne und das N-terminale Motiv von Bem2. Die Domänen wurden mit den unten aufgeführten Primern amplifiziert und in den pGEX4T-1 ligiert.

MD716 bem2 5'GEF gatacatatgGCTGTGGTTGCCGAGAAAAACC

MD717 bem2 3'GEF atcgcgccgcctaAACGTGCACGGGCATA

pBem2-Kond

Das Konstrukt wurde mittels *drag& drop cloning* in den Vektor pRS426 kloniert. Die homologen Sequenzbereiche, zur Rekombination in *U. maydis*, wurden mit den unten genannten Primern amplifiziert. Vor dem Einbringen in *U. maydis*, wurde es mit SspI linearisiert.

MD852 cbem2 Sc 5'RF gccaaaaagataccataataggcctgagtggccATGCCGCTCTCGTC
CCACCACCACCACCAC

MD853 cbem2 Sc 3'RF gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatATTGCGATC
GGCGGAAGCGGGTGTGTGTTG

MD818bem2 Sc LF 5' gtaacgccagggtttccagtcacgacgaatATTCACGATTCTGA
AAAGGACTCCAGTCAGG

MD819bem2 LF Sc 3' attgtcacgccatggtggccatctaggccGGTGAGGGTGGG
CTATACGCTTGTTACGTG

pKpp4 Δ NAT

Das Konstrukt wurde mittels *drag& drop cloning* in den Vektor pRS426 kloniert. Die homologen Sequenzbereiche, zur Rekombination in *U. maydis*, wurden mit den unten genannten Primern amplifiziert. Vor dem Einbringen in *U. maydis*, wurde es mit SspI linearisiert.

ME144 5'LF dkpp4	gtaacgccagggttttcccagtcacgacgaatATTCGTGATTTCGTTACGT ATTCATG
ME145 3'LF dkpp4	attgtcacgccatggtggccatctaggccACGTGTTGGGAGCTGAGTGAAG AGGCAAAG
ME146 5'RF dkpp4	gtgcggccgcattaataggcctgagtggccACTGCACCTCACAAGCAATT TGCGAAGC
ME147 3'RF dkpp4	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatATTGGGCGCACAAATTGCCC GTGAAAGC

pKpp4 Δ Hyg

Das Konstrukt pKpp4 Δ Nat wurde mit SfiI geschnitten und die Resistenzkassette gegen die aus pMF1-H ausgetauscht. Vor dem Einbringen in *U. maydis*, wurde es mit SspI linearisiert.

pUac1 Δ NAT

Das Konstrukt wurde mittels *drag& drop cloning* in den Vektor pRS426 kloniert. Vor dem Einbringen in *U. maydis*, wurde es mit SspI linearisiert.

ME140 5'LF duac1	gtaacgccagggttttcccagtcacgacgaatATTTGCTGTTCTCGGC AAGAGCCTGTG
ME141 3'LF duac1	attgtcacgccatggtggccatctaggccGTACGAGGATTGAACGAAAC CTCGCTTGC
ME142 5'RF duac1	gtgcggccgcattaataggcctgagtggccGCGCGCGCCTGGTGGTTGTTT CGAAATAG
ME143 3'RF duac1	gcggataacaatttcacacaggaaacagcaatATTCAGCTTCCAGCCTGT CTCGTTTAC

4.1.14 λ -DNA

Als Mengen- und Größen-Standard für die DNA-Gelelektrophorese diente λ -DNA von der Fa. MBI Fermentas. Für die Verwendung als Mengenstandard wurde diese auf 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. Die durch Inkubation mit dem Restriktionsenzym *Pst*I entstehenden Fragmente für den Größenstandard wiesen folgende Längen in Basenpaaren (bp) auf: 14057, 11506, 5077, 4749, 4507, 2838, 2556, 2459, 2443, 2140, 1986, 1700, 1159, 1093, 805, 514, 468, 448, 339, 264, 247, 216, 211, 200, 164, 150, 94, 87, 72, 15.

5 Methoden

5.1 Anzucht von Mikroorganismen

5.1.1 Anzucht von *E. coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden in autoklaviertem dYT-Medium unter aeroben Bedingungen angezogen. Dem Medium wurde, wenn nötig, Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Zur Kultivierung auf Festmedium wurde dYT-Agar verwendet, wenn nötig mit obengenannter Konzentration an Ampicillin. Zum Nachweis von β -Galaktosidase-Aktivität im Blau-Weiß-Test wurde X-Gal mit einer Endkonzentration von 0,02 % (w/v) zugegeben. Bei der Anzuchttemperatur wurde für Über-Nacht-Kulturen (ÜNKs) 37°C gewählt. Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden ÜNKs mit dYT-Glycerin-Medium in Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C eingefroren.

5.1.2 Anzucht von *U. maydis*

Flüssigkulturen von *U. maydis* wurden meist auf YEPS-Medium angezogen, wobei auf gute Durchlüftung des Medium geachtet wurde, um aerobe Bedingungen zu gewährleisten. Wenn nötig, wurde Hygromycin (200 µg/ml Endkonzentration), Carboxin (2 µg/ml Endkonzentration) oder Nourseothricin (150 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Die Zugabe der sterilfiltrierten Antibiotika (ABs) erfolgte nach dem Autoklavieren. Die Induktion des *crg*-Promotors erfolgte meist auf YNB-A-Medium. In einigen Fällen wurde auch CM-Medium mit 1 % (w/v) Glukose oder Arabinose verwendet. Die Anzucht der Kulturen erfolgte über Nacht oder bis zu mehreren Tagen bei 28°C. Die Kultivierung auf Festmedium geschah auf YNB-G-Agar, YNB-A-Agar, PD-Agar, YNB-Regenerationsagar oder Regenerationsagar, falls erforderlich mit oben genannten AB-Konzentrationen. Für Dauerkulturen wurden ÜNKs mit NSY-Glycerin-Medium im Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C gelagert.

5.1.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Kultivierung von *S. cerevisiae* in Flüssigmedium

Die Anzucht von *S. cerevisiae* in Flüssigmedium erfolgte, solange nicht auf Auxotrophiemarker selektiert werden sollte, in YPD. Bei der Selektion auf Auxotrophiemarker erfolgte die Anzucht in "Synthetic Complete"-Medium, dem die den Selektionsmarkern entsprechenden Amino- bzw. Nukleinsäuren fehlten.

Kultivierung von *S. cerevisiae* auf Festmedium

Die Anzucht von *S. cerevisiae* auf Festmedium erfolgte, solange nicht auf Auxotrophiemarker selektiert werden sollte, auf YPD-Festmedium. Bei der Selektion auf Auxotrophiemarker erfolgte die Anzucht auf "Synthetic Complete"-Festmedium, dem die den Selektionsmarkern entsprechenden Amino- bzw. Nukleinsäuren fehlten.

Langzeitlagerung von *S. cerevisiae*

Die Langzeitlagerung von *S. cerevisiae* erfolgte in NSY-Glycerin-Medium. Hierzu wurde 1 ml einer dichten Kultur mit 1ml NSY-Glycerin-Medium gemischt und in 2ml Cryoröhrchen bei -8°C eingefroren.

5.2 DNA-Präparationen

5.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* - analytischer Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach der Methode der Alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) oder alternativ der Kochenden Lyse durchgeführt. In einigen Fällen wurde auch das peqGOLD Plasmid Mini Prep Kit I nach Herstellerangaben verwendet.

Alkalische Lyse

Es wurden 1,5 ml ÜNK in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT, Tischzentrifuge) und der Niederschlag nach Entfernen des Überstandes in 100 µl SolA resuspendiert. Nachfolgend wurden in 5-Minuten-Abständen nacheinander 200 µl SolB und 150 µl SolC dazugemischt. Die Inkubation erfolgte auf Eis. Nach Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT, Tischzentrifuge) wurde der Überstand in ein neues

Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert (15 min, 14000 rpm, 4°C, Tischzentrifuge). Die obere Phase wurde in ein neues Cup überführt und mit 400 µl Isopropanol versetzt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm, 20 min, 4°C in der Tischzentrifuge. Das Pellet wurde anschließend mit 400 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und der verbliebene Alkohol restlos entfernt. Die sedimentierte DNA wurde in 30 µl Wasser aufgenommen, für 10 min bei RT auf dem Eppendorf-Schüttler gelöst und bei -20°C gelagert.

Kochende Lyse

Es wurden 1,5 ml ÜNK in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT, Tischzentrifuge) und der Niederschlag nach Entfernen des Überstandes in 350 µl Stet-Puffer und 25 µl Lysozym 5 min schüttelnd inkubiert. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf Heizblock inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT, Tischzentrifuge) wurde das Pellet mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 40 µl 3 M Natriumacetat- Lösung und 400 µl Isopropanol zugegeben, gemischt und zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, RT, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, 5 min getrocknet, in 30 µl TE mit 0,1 mg/ml RNaseA aufgenommen und 30 min bei RT im Eppendorf-Schüttler gelöst.

5.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* - präparativer Maßstab

Die Präparation im von Plasmid-DNA im größeren Maßstab erfolgte mit dem Jetstar Maxi- Kit der Firma Genomed nach Herstellerangaben.

5.2.3 Präparation DNA aus *U. maydis* für PCR

Eine Kultur von *U. maydis* wurde bis zu einer OD600 von 0,3 - 0,4 auf YEPS angezogen und 2 ml davon wurden in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT, Tischzentrifuge). Das Sediment wurde in 500 µl Lysis-Puffer resuspendiert und anschließend mit 0,3 g Glasperlen (425-600 Micron) und 500 µl Phenol/Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde auf dem Vortexer geschüttelt (10 min, RT) und nachfolgend zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, RT, Tischzentrifuge). 450 µl des Überstandes wurden mit 315 µl Isopropanol gemischt und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, RT, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und an der

Luft getrocknet. Dann wurde das Sediment in 50 µl TE mit RNaseA aufgenommen, 30 min bei RT im Eppendorf-Schüttler gelöst und bei -20°C gelagert.

5.2.4 Präparation von DNA aus *U. maydis* für Southern Blot

15 ml einer Übernachtskultur von *U. maydis* wurden in einem 15 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (4300 rpm, 15 min, 4°C, Heraeus-Zentrifuge). Das Medium wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Wasser resuspendiert. Es erfolgte eine Zentrifugation (4300 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde mit 200 µl Lysis-Puffer und 0,3g Glasperlen (425-600 Micron) versetzt. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform wurde 3,5 min gevortext. Anschließend wurden 200 µl TE-Puffer zugesetzt. Das Gemisch wurde abzentrifugiert (4000 rpm, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Cup gegeben. Es wurde 1 ml 96 % Ethanol zugegeben, gemischt und abzentrifugiert (4000 rpm, 2 min, 4°C, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde 10 min getrocknet und in 400 µl TE mit 0,1 mg/ml RNaseA gelöst. Die Lösung wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion wurden 400 µl Phenol/Chloroform zugegeben und nach Vortexen abzentrifugiert (13000 rpm, 15 min, RT, Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und mit 11 µl 3 M Natriumacetat versetzt. Anschließend wurde 1 ml Ethanol zugegeben und gemischt. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 2 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Schließlich wurde es nach einer 10 minütigen Trocknung bei RT in 50 µl TE resuspendiert. Hierfür wurde es für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

5.3 Amplifikation und Klonierung von DNA

5.3.1 Amplifikation von DNA über Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Innis and Gelfand, 1990). Mit Hilfe der PCR-Amplifikation können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen DNA-Gemisch selektiv angereichert werden. Man benötigt hierzu zwei Primer, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereiches komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem Trio-Thermoblock

(Biometra) oder einem Personal Cycler (Biometra) durchgeführt. Es wurde wahlweise die Taq-Polymerase oder die Pfx-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion verwendet.

Reaktions-Ansatz (Taq-Polymerase)

10 % (v/v) Taq-Puffer (10x)
1,5 mM MgCl₂
0,2 mM dNTPs
je 0,5 µM Primer 1 und Primer 2
0,5 U Taq-Polymerase
10-100 ng DNA-Matrize
30-35x

PCR-Programm:

10 min, 94°C anfänglicher
Denaturierungs-Schritt
1 min, 94°C Denaturierung
1 min, 40-70°C Anlagerung der Primer,
Temperatur abhängig vom Primer
1 min je 1 kb, 72°C Elongation
30-35 Zyklen
10 min, 72°C finale Polymerisation

Reaktions-Ansatz (Pfx-Polymerase)

10 % (v/v) Pfx-Amplifikationpuffer (10x)
1 mM MgSO₄
0,3 mM dNTPs
je 0,3 µM Primer 1 und Primer 2
0,5 U Pfx-Polymerase
0,01-100 ng DNA-Matrize

PCR-Programm:

2 min, 94°C anfängliche Denaturierung
15 sec, 94°C Denaturierung,
30 sec, 40-70°C Anlagerung der Primer,
Temperatur abhängig vom Primer
1 min je 1 kb, 68°C Elongation
30-35 Zyklen
10 min, 68°C finale Polymerisation

Die Wahl der Hybridisierungstemperatur war abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Diese ist definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte der Primer mit DNA gepaart, die andere Hälfte aber ungebunden vorliegt. Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils 5°C niedriger als die Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur gewählt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

5.3.2 Restriktions-Analyse von DNA

Zum Schneiden von DNA wurden Restriktions-Endonukleasen und die dazugehörigen Puffersysteme der Firmen New England Biolabs und Amersham Pharmacia nach Herstellerangaben verwendet. Zusätzlich wurden die Reaktionen mit einer

Endkonzentration von 50 µg/µl RNaseA versetzt. Bei Verwendung zweier Enzyme wurde der Puffer gewählt, bei dem beide Enzyme die höchste Aktivität hatten, ohne jedoch Star-Aktivitäten aufzuweisen. War dies nicht möglich oder weniger optimal, so wurde die DNA zunächst mit dem einem Enzym geschnitten und dann mit 1 Volumen Isopropanol gefällt (10 min, 4°C, 14000 rpm, Tischzentrifuge). Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol, nochmaligem Zentrifugieren und anschließendem Trocknen wurde das Pellet in wenigen µl H₂O (Braun) gelöst und die DNA mit dem zweiten Enzym geschnitten.

5.3.3 Dephosphorylierung von DNA

Zur Verhinderung einer Religation von linearisierten Plasmiden in einer späteren Ligation wurden die 5'-Enden durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) dephosphoryliert. Dazu wurden 44 µl DNA-Lösung mit 5 µl 10 x CIP-Puffer und 1 µl CIP versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktion 150 µl H₂O und 200 µl Phenol/Chloroform beigelegt. Nach gründlichem Durchmischen der Phasen wurde für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA mit 2 Volumen 96 %igem Ethanol gefällt. Nach dem Waschen des Pellets mit 70 % Ethanol und vollständigem Trocknen wurde die DNA in 10 µl H₂O gelöst.

Alternativ wurde die DNA mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (SAP) dephosphoryliert. Hier wurden 44 µl DNA-Lösung mit 5 µl SAP-Puffer und 1 µl SAP 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte hier durch Inkubation für 15 min bei 65°C. Eine anschließende Fällung war hier nicht nötig.

5.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung zweier oder auch mehrerer DNA-Fragmente ist mit T4-DNALigase möglich. Für die Ligation von Fragmenten in ein geöffnetes Plasmid wurden 100 ng dephosphorylierte Plasmid-DNA mit 1 µl 10 x Ligase-Puffer, 0,5 U T4-DNA-Ligase und bis zu 7,5 µl Lösung des oder der zu klonierenden Fragmente vermengt (10 µl Endvolumen). Nach einer Inkubation von 2-3 h bei RT oder ÜN bei 14°C wurde 1 µl des Ansatzes in elektrokompente oder chemokompente *E. coli*-Zellen transformiert.

5.3.5 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA

Die Transformation der Hefe *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA erfolgte nach einer Variante der Lithiumacetat-PEG-Transformation (H. Ulrich, pers. Mitteilung). Der zu transformierende Hefestamm wurde in 50 ml YPD oder Selektionsmedium über Nacht bei 30°C bis zu einer OD600 von 0.5 bis 1.5 angezogen. Die Kultur wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 3000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in einem angepassten Volumen LiT aufgenommen (1300 µl / 12 Transformationen). 100 µl dieses Ansatzes wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Es wurden 5 µl (10mg/ml) denaturierte (für 5 min auf 95°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt) Heringssperma-DNA und 1 µg Plasmid-DNA (1 µl Midipräp oder 4 µl Minipräp) hinzugefügt. Zu diesem Ansatz wurden 500 µl LiT-PEG zugeben und gut durchmischt. Es folgte eine Inkubation für 15 min bis 1h bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 µl DMSO zugegeben. Es folgte eine Hitzeschockbehandlung für 15 min bei 42°C. Nach Ende des Hitzeschocks wurde der Ansatz für 30 s bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 100 µl H₂O resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

5.3.6 Herstellung von Deletionskonstrukten für *U. maydis* mittels

Rekombination in *S. cerevisiae*

Die Herstellung von Konstrukten für die Transformation von *Ustilago maydis* erfordert mehrere Schritte, die oftmals mit einem größeren Zeit- und Arbeitsaufwand einhergehen. Aus diesem Grund wurde eine Ein-Schritt-Methode zur Herstellung dieser Konstrukte genutzt (Colot et al., 2006). Diese Methode macht sich die Eigenschaften der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu nutzen, homologe Rekombination mit sehr kurzen Homologie-Regionen hoch effizient durchzuführen. Die wurde benutzt, um Konstrukte für die genetische Manipulation von *U. maydis* durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* herzustellen. Die folgenden Schritte beschreiben die Erstellung eines Konstruktes für die Deletion von Genen in *Ustilago maydis*, Konstrukte für andere Manipulationen des Genoms wie z.B. das Herstellen von GFP-Fusionen können über entsprechende Anpassung der flankierenden Bereiche und Resistenzkassetten durchgeführt werden. Zur Erstellung eines Deletionskonstruktes wurden zunächst ungefähr je 1kb der flankierenden Bereiche des Gens mittels PCR amplifiziert; die Primer für diese PCR tragen neben den Homologien zur Zielsequenz zusätzlich

homologe Bereiche zu der verwendeten Resistenzkassette (Primer 5' reverse und 3' forward) bzw. homologe Bereiche zu dem Hefe-Shuttlevektor pRS426 (Primer 5' forward und 3'reverse). Die PCR-Produkte wurden lediglich gefällt und mit einer Resistenzkassette und mit dem Vektor pRS426 gemischt. Mit diesen DNA-Fragmenten wurde dann der Hefestamm DF5 *his1-1* transformiert und auf Transformanten mit einer Uracil-Mangelmediumplatte selektiert. Die hieraus resultierenden Klone wurden von der Platte abgeschwemmt und aus ihnen Plasmid-DNA isoliert. Mit dieser DNA wurden chemokompetente *E. coli*-Zellen transformiert und die resultierenden Klone mittels Plasmid-Isolation und anschließendem Restriktionsverdau charakterisiert.

5.4 Analyse von DNA

5.4.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Ermittlung der DNA-Konzentration in wässrigen Lösungen wurden verschiedene Verdünnungen auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarose-Gel aufgetragen. Als Mengen-Referenz diente λ -DNA (10, 30, 60 ng). Nach kurzer Gelelektrophorese konnte die Konzentration anhand der Banden-Intensität im Vergleich zur λ -DNA ermittelt werden.

5.4.2 Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese wurde eine horizontale Elektrophorese-Apparatur verwendet. Eine Suspension von 0,8 bis 2 % Agarose in TAE-Puffer wurde bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht und auf ca. 60°C erkalten lassen. Anschließend wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1-5 $\mu\text{g/ml}$) und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Gelkamm gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Gelkamm gezogen und der Schlitten in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur gelegt.

Die Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen gegeben. Als Größen-Standard diente mit *Pst*I vollständig geschnittene λ -DNA (s. Material). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 25 – 100 V. Da sich das Ethidiumbromid in die DNA einlagert, konnte diese anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und

photographiert werden. Nach der Gelelektrophorese konnten einzelne Banden aus den Agarose-Gelen ausgeschnitten und die DNA daraus isoliert werden. Hierzu wurde der QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben verwendet.

5.4.3 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung einer DNA-Sequenz wurde die Kettenabbruch-Methode durch Didesoxyribonukleotide nach Sanger (Sanger et al., 1977) gewählt. Die zu sequenzierende Plasmid-DNA dient hierbei während einer Polymerase-Kettenreaktion als Matrize. Die Didesoxyribonukleotide, die zum Kettenabbruch führen, sind mit verschiedenen Fluoreszenzträgern markiert. Es wurden 5 pmol Primer und ca. 400 ng gelöste DNA je Reaktion eingesetzt. Diese Komponenten wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 µl BigDye Terminator v3.1 Cycle Mix und 3 µl Reaction Buffer versetzt und einer PCR mit folgenden Parametern unterworfen:

1 min, 99°C anfänglicher Denaturierungs-Schritt

10 sec, 96°C Denaturierung

30 sec, 50°C Anlagerung der Primer

4 min, 60°C Elongation

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Zugabe von 10 µl 125 mM EDTA, 9 µl 3 M Natriumacetat, 80 µl Wasser und 400 µl Ethanol (96 %) gefällt. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge. Anschließend wurde zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen und jeweils für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl Formamid- Mix resuspendiert und zur Sequenzierung abgegeben.

5.4.4 Transfer und Detektion von DNA auf Membranen

Zur Auffindung von DNA-Restriktionsfragmenten bestimmter Größen wurde die Southern-Blotting Methode durchgeführt (Southern, 1975). Die nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Nylon-Membran übertragenen DNA-Fragmente können hierbei durch anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert werden.

Transfer von DNA (Southern Blotting)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung eines Restriktionsansatzes von genomischer oder auch Plasmid-DNA auf einem 0,8 %igem Agarose-Gel wurde dieses zur Dokumentation unter UV-Licht photographiert. Nacheinander wurde es dann für 15 min zur Depurinierung in 0,25 M HCl und für 15 min zur Denaturierung in 0,4 M NaOH bei leichtem Schwenken inkubiert. Für den Transfer auf eine Biotinyl-B-Nylonmembran wurde die aufwärts gerichtete Methode gewählt. Hierzu wurde eine Schale mit 0,4 M NaOH gefüllt. Über die Schale wurde ein Deckel quer gelegt. Über diesen Deckel wurde ein mit 0,4 M NaOH getränkter Streifen Whatman-Papier so gelegt, dass beide Enden in die NaOH-Lösung hingen. Dieser wurde mit drei Lagen NaOH getränktem Whatman-Papier überschichtet. Anschließend folgte das Gel, so orientiert, dass seine Taschenöffnungen unten lagen. Auf dieses wurde die Nylonmembran, gefolgt von drei Schichten Whatman-Papier und einem dicken Stapel saugfähigem Laborpapier, gelegt. Zwischen das Gel und die Membran wurde zur seitlichen Abdichtung an den Rändern etwa 5 mm weit wasserdichter Parafilm eingeführt. Auf diese Konstruktion wurde zur Beschwerung ein Gewicht von etwa 400 g gelegt. Das Blotten erfolgte über Nacht: Die NaOH-Lösung wurde dabei von dem Papier durch das Gel und die Membran nach oben gesaugt. Hierdurch wurde die DNA auf die Membran überführt. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker) auf der Membran fixiert.

5.4.5 Herstellung radioaktiver DNA-Sonden

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurde der Megaprime Labeling Kit verwendet. Das ausgewählte DNA-Restriktions-Fragment (ca. 25 ng) wurde mit 5 µl des im Kit vorhandenen Primers versetzt und mit H₂O auf 33 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 min bei 95°C denaturiert. Nachfolgend wurden 10 µl Labeling-Puffer Lösung und 5 µl radioaktives [³²P]αdCTP beigefügt. Durch Zugabe von 2 µl Klenow-Enzym-Lösung wurde die Reaktion gestartet und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch den Einbau des [³²P]αdCTPs in die neu synthetisierten DNA-Stränge wurden diese radioaktiv markiert. Zur Entfernung der nicht eingebauten Nukleotide wurde der Ansatz über eine MobiSpin S-200 Sephacryl-Säule nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Sonde wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Hybridisierung

Die auf der Nylon-Membran fixierte DNA wurde nach der Methode von Church und Gilbert (Church and Gilbert, 1984) mit der radioaktiven Sonde hybridisiert. Zunächst wurde die Membran für 20 min bei 60°C mit Southern-Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die für 5 min bei 95°C denaturierte Sonde wurde zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen drehend inkubiert. Die Hybridisierungs-Lösung wurde entfernt und die Membran zweimal mit 20 ml Southern- Waschpuffer für jeweils 20 min bei 65°C gewaschen. Nach dem Einschlagen der Membran in Klarsichtfolie wurde ein Storage Phosphor-Screen (Amersham) über Nacht mit der strahlenden Membran belichtet. Dieser wurde dann mit einem STORM 860 Phosphoimager (Molecular Dynamics) analysiert und die erhaltenen Signale mit der Software STORM Image Quant analysiert.

5.4.6 Präparation von RNA

Zur Präparation von RNA wurden ausschließlich autoklavierte Gefäße und Materialien verwendet, alle wässrigen Lösungen waren durch Zugabe von 1/1000 Vol DEPC von RNAsen befreit worden. Zur Präparation wurden 15 ml Kultur mit einer OD600 von ca. 500 abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Nach Entfernung des Mediums wurde das Pellet in 400 ml AE-Puffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Es wurden 40 µl 10 % SDS zugegeben, gevortext und direkt anschließend 400 µl 65°C warmes mit AE-Puffer gesättigtes Phenol zugegeben, gevortext und 10 min schüttelnd auf 65°C Eppendorffheizblock inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei -80°C und eine anschließende Zentrifugation (2 min, 13000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Die RNA wurde zum weiteren Reinigen mit 400 µl Phenol/Chloroform versetzt, gevortext und erneut zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zuführen von 1/10 Vol 3 M Natriumacetat-Lösung und 1 Vol 98 % Ethanol, Vortexen und Zentrifugieren (10 min, 13000 rpm, 4°C, Laborzentrifuge) gefällt. Die RNA wurde nun mit 70 % Ethanol gewaschen und in 30 µl TE mit 1 % Proteinase K aufgenommen. Die präparierte RNA wurde direkt für weitere Analyse eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

5.5 Analyse von RNA

5.5.1 Auftrennung von RNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese wurde eine horizontale Elektrophorese-Apparatur verwendet. Eine Suspension von 1 % Agarose in MOPS-Puffer wurde bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgeköcht und auf ca. 60°C erkalten lassen. Anschließend wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1-5 µg/ml) und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Gelkamm gegossen, der zuvor mit RNase-Away (Invitrogen) behandelt worden war. Nach dem Erstarren wurde der Gelkamm gezogen und der Schlitten in die mit MOPS-Puffer gefüllte RNase-freie Elektrophorese-Apparatur gelegt. Die RNA-Proben (etwa 2,5 µg) wurden in einem Endvolumen von 40 µl mit 2 µl MOPS (10 x), 2 µl Glyoxal (8 M), und 10 µl DMSO versetzt und zwischen 30 Minuten und einer Stunde bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden 6 µl RNA-Auftragspuffer zugegeben und die Proben wurden in die Taschen gegeben. Als Größen-Standard diente mit *Pst*I vollständig geschnittene λ-DNA (s. Material). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 90 V. Alle 30 min wurde die Polung der Kammer und die Orientierung des Gels in der Kammer umgekehrt, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten. Da sich das Ethidiumbromid in die RNA einlagert, konnte diese anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert werden.

5.5.2 Transfer und Detektion von RNA auf Membranen

Zur Untersuchung der Expressionsstärke eines Genes wurde die Northern Blotting Methode angewandt. Die nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Nylon-Membran übertragene RNA kann hierbei durch anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert werden.

Transfer von RNA (Northern Blotting)

Für den Transfer auf eine Biotransfer-Membran wurde die aufwärts gerichtete Methode gewählt. Hierzu wurde eine Wanne mit 20 x SSC gefüllt. Über die Wanne wurde eine Glasplatte quer gelegt. Über diese Glasplatte wurde ein mit 20 x SSC getränkter Streifen Whatman-Papier so gelegt, dass beide Enden in die 20 x SSC-Lösung hingen. Dieser wurde mit drei Lagen 20 x SSC getränktem Whatman-Papier

überschichtet. Anschließend folgte das zuvor für eine Viertelstunde in 20 x SSC gebadete Gel, so orientiert, dass seine Taschenöffnungen unten lagen. Auf dieses wurde die Nylonmembran, gefolgt von drei Schichten Whatman-Papier und einem dicken Stapel saugfähigem Laborpapier gelegt. Zwischen das Gel und die Membran wurde zur seitlichen Abdichtung an den Rändern etwa 5 mm weit wasserdichter Parafilm eingeführt. Auf diese Konstruktion wurde zur Beschwerung ein Gewicht von etwa 400 g gelegt. Das Blotting erfolgte über Nacht: Die 20 x SSC-Lösung wurde dabei von dem Papier durch das Gel und die Membran nach oben gesaugt. Hierdurch wurde die RNA auf die Membran überführt. Anschließend wurde die Membran 30 min getrocknet und die RNA durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker) auf der Membran fixiert.

Hybridisierung

Die auf der Nylon-Membran fixierte DNA wurde nach der Methode von Church und Gilbert (Church and Gilbert, 1984) mit der radioaktiven Sonde hybridisiert. Zunächst wurde die Membran für 20 min bei 60°C mit Northern-Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die für 5 min bei 95°C denaturierte Sonde wurde zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 60°C im Hybridisierungssofen drehend inkubiert. Die Hybridisierungs-Lösung wurde entfernt und die Membran zweimal mit 20 ml Northern- Waschpuffer für jeweils 20 min bei 60°C gewaschen. Nach dem Einschweißen der Membran in Klarsichtfolie wurde diese in einer Phosphorimager Kassette exponiert. Die Detektion der radioaktiven Signale wurde dann mit Hilfe eines Phosphorimagers (Storm860, der Fa. Amersham, Braunschweig) ausgewertet.

Stripping

Um die hybridisierte Sonde wieder von der Membran zu entfernen (Stripping), bevor diese mit einer anderen Sonde hybridisiert wurde, wurde sie mit Northern-Strip-Puffer versetzt und für zwei Stunden bei 85°C im Hybridisierungssofen drehend inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit Northern-Waschpuffer 20 min bei 65°C gewaschen. Dann konnte sie für eine erneute Hybridisierung eingesetzt werden.

5.5.3 Quantifizierung der Bandenintensität

Zur Quantifizierung der Intensität von im Northern Blot erhaltenen RNA-Banden kam die Software ImageJ (Rasband, 1997) zum Einsatz. Hierfür wurden die einzelnen Banden mit dem Tool *Rectangular Selections* markiert und der durchschnittliche

Grauwert *Mean Gray Value* durch das Tool *Measure* im Menü *Analyze* bestimmt. Von diesem Wert wurde der für den Hintergrund des Blots erhaltene Wert abgezogen. Um die Werte der einzelnen Banden auf die jeweils in der Spur eingesetzte Gesamtmenge an RNA zu normieren, wurde der für die Banden erhaltene Wert durch den in der gleichen Spur für *ppi* erhaltenen Wert dividiert.

5.6 Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

5.6.1 Produktion von rekombinanten Ras-Proteinen

Rekombinante Ras-Proteine wurden als GST-Fusionsprotein in *Escherichia coli* produziert (Self and Hall, 1995). Zur Expression dieser Konstrukte wurden die entsprechenden codierenden Bereiche in den GST-Expressionsvektor pGEX4T-1 ligiert. Nach klonaler Vermehrung in *E. coli* und Verifikation der resultierenden Expressionsvektoren durch Sequenzierung wurden verschiedene *E. coli*-Expressionsstämme mit den Vektoren transformiert. Die idealen Bedingungen für die Proteinproduktion wurden zunächst anhand einer Induktion im kleinen Maßstab bestimmt und dann eine Großkultur unter den entsprechenden Bedingungen induziert. Für kleine GTPasen der Ras-Familie aus *U. maydis* hat es sich bewährt, die Proteinproduktion bei geringen IPTG-Mengen (0,1 - 0,2 mM) und einer gesenkten Temperatur (22°C) über Nacht durchzuführen. Unter diesen Bedingungen war sowohl die Löslichkeit als auch die Aktivität der gereinigten Proteine am höchsten. Es wurde zunächst eine Vorkultur angezogen, aus der dann eine Großkultur im Verhältnis 1:100 inokuliert wurde. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,6 wurde die Temperatur auf 22°C gesenkt und die Induktion der Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,1 - 0,2 mM induziert. Die Induktion erfolgte dann für 10 - 12h bzw. über Nacht. Die Kultur wurde anschließend durch Zentrifugation geerntet, der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen entweder direkt weiter verarbeitet oder bei -80°C gelagert.

5.6.2 Aufreinigung von RasGTPasen aus *E. coli*

Alle Reinigungsschritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C. Alle genutzten Puffer wurden vor Benutzung entgast und mit 5 mM DTT versetzt, um eine Oxidation der GTPasen zu verhindern. Die sedimentierten Zellen wurden in GTPase-Lysepuffer, der mit Protease-Inhibitoren (Complete ohne EDTA (Roche)) versetzt war, resuspendiert und mittels 3 Passagen durch eine "French-Press"-Zelle lysiert. Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt (100000 x g, 1h) sedimentiert und der geklärte Überstand durch einen 0,45 µm-Sterilfilter weiter gereinigt. Die weitere Reinigung erfolgte mit Hilfe einer Waters 950 FPLC-Anlage. Der Überstand wurde auf eine prääquilibrierte GSTrap-Säule (GE Healthcare) aufgetragen, ausgiebig mit GTPase-Lysepuffer gewaschen und anschließend mit Elutionspuffer eluiert. Protein-haltige Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen GEF-Assay-Puffer dialysiert. Die dialysierten Proteine wurden mit Hilfe von Vivaspin Ultrafiltrationssäulen (Sartorius, Göttingen) auf eine Endkonzentration von 50 µM ankonzentriert und dann in kleinen Aliquots bei -80°C gelagert. Die Qualität der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels überprüft.

5.6.3 Produktion und Aufreinigung von rekombinanten RasGEFs aus *E. coli*

Rekombinante RasGEFs, bzw. RasGEF-Domäne und N-terminales Motiv, wurden als GST- oder Hexa-Histidin-Fusionsproteine in *E. coli* überproduziert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Überproduktion und Aufreinigung erfolgte analog zu den bereits für die Ras-GTPasen beschriebenen Methoden..

5.7 Analyse von Proteinen

5.7.1 Proteinextraktion aus *U. maydis*

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus *U. maydis* wurden 25 ml einer dichten Flüssigkultur zentrifugiert (3500 rpm, 5 min, RT) und das Sediment in 10 ml TBS-Puffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3500 rpm, 5 min, RT) wurde das Sediment in 500 µl TBS aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Zellsuspension wurden 0,3 g Glasperlen, 5 µl 10 % Triton X-100 und 5 µl Protease Inhibitor Cocktail für Pilze (Sigma) zugesetzt und der Ansatz in flüssigem

Stickstoff schockgefroren. Dann wurde das Reaktionsgefäß bei 4°C 30 min auf dem Vibrax geschüttelt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C). Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Langzeitlagerung der Proteine erfolgte bei -80°C.

5.7.2 Konzentrationsbestimmung

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford, allerdings in einer modifizierte Form mit Biorad-Reagenz (Biorad). Die Proteinproben wurden auf ein Endvolumen von 100 µl um den Faktor 1:10 in TBS verdünnt. 10 µl davon wurden mit 990 µl der um den Faktor 1:5 verdünnten Biorad-Lösung gemischt. Der Nachweis erfolgte sofort im Photometer bei einer Wellenlänge von 595nm. Zur Standardisierung wurden BSA-Verdünnungsreihen mit definierten Konzentrationen eingesetzt.

5.7.3 SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteinextrakte erfolgte auf SDS-haltigen Polyacrylamidgelen.

Trenngel (4ml):

	6%	8%	10%	12%	15%	20%
1 M Tris-HCl pH=8.8	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5ml	1.5ml
Acrylamid	600µl	1067µl	1.33ml	1.6ml	2ml	2667µl
H ₂ O	1600µl	1330µl	1067µl	800µl	400µl	-
10 % SDS (w/v)	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl
10% APS	66µl	66µl	66µl	66µl	66µl	66µl
TEMED	7µl	7µl	7µl	7µl	7µl	7µl

Sammelgel:

	für 1.6ml	für 2ml	für 4ml
1M Tris-HCl pH=6.8	200µl	250 µl	500µl
Acrylamid	267µl	333µl	666µl
H ₂ O	1.12ml	1.4ml	2.25ml
10 % SDS (w/v)	16µl	20µl	40µl
10% APS	26.4µl	33µl	66µl
TEMED	4.0µl	5.0µl	10.0µl

Für die Proteingele wurden Mini-Protean 2 Apparaturen (Biorad) verwendet. Die Apparatur wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt, auf ihre Dichtheit überprüft. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels, wurde der Alkohol vollständig abgenommen, das Sammelgel eingegossen und der Kamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels, wurde der Kamm entfernt, die Taschen sorgfältig gespült und das Gel in die vertikale Laufkammer eingesetzt. Die äußere und die innere Pufferkammer wurden mit Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden in TBS auf eine Konzentration von 2 µg/µl verdünnt und je 10 µl dieser Proteinlösung mit 3 µl 3x Probenpuffer versetzt. Die Ansätze wurden 5 min zur Denaturierung aufgekocht, kurz auf Eis heruntergekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V. Als Größenstandard wurde der Marker "Page Ruler Prestained Protein Ladder" der Firma Fermentas verwendet.

5.7.4 Transfer und Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Die Proteine wurden auf einer PVDF-Membran durch Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Für den Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Roth) wurde ein "Wet Blot" durchgeführt. Der Blot wurde auf die Anodenplatte der Blotapparatur aufgeschichtet. Ein in Transferpuffer getränktes Schwämmchen wurden mit zwei Lagen getränktes Blotting-Papier überschichtet. Darauf wurde die, durch Benetzen mit Methanol aktivierte und in Transferpuffer äquilibrierte, PVDF-Membran gelegt. Das Trenngel wurde auf die Membran aufgelegt und mit zwei Lagen in Transferpuffer getränkter Blotting-Papiere und einem weiteren Schwämmchen überschichtet. Die Kathodenplatte wurde aufgesetzt und das Gel eine Stunde bei 30V über Nacht geblottet. Die Membran wurde in TBST0,1-Milch 20 min unter Rotation ab gesättigt und in einen Plastikbeutel eingeschweißt. In diesen wurden 10 ml einer 1:400 Verdünnung des primären Antikörpers (GFP mouse monoclonal IgG2a, Santa Cruz Biotechnology) in TBST0,1-Milch eingefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Dann wurde die Membran 3x 10 min in 10 ml TBST0,1 gewaschen und danach mit einer 1:1000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (donkey anti-mouse IgG-HRP conjugate, Santa Cruz Biotechnology) in TBST0,1-Milch zwei Stunden bei

Raumtemperatur inkubiert. Zum Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz wurde die Membran 3x 10 min in 10 ml TBST_{0,1} gewaschen, abgetropft und in eine nach drei Seiten hin offene Plastikhülle gelegt. 0,5 ml der Detektionslösung 1 wurden mit 0,5 ml der Detektionslösung 2 (Amersham) gemischt und auf die Membran aufgetropft. Überschüssige Lösung wurde zu den Seiten hin aus der Plastikhülle gestrichen. Die Membran wurde in ihrer Hülle in eine Röntgenkassette eingelegt, ein Film aufgelegt und der Blot für 15 min in der geschlossenen Kassette exponiert. Dann wurde der Film entwickelt. Die Membran wurde 1 min in einer Schale Ponceau-S-Lösung (Sigma) gebadet und dann so lange in Wasser entfärbt, bis die Gesamtheit der Proteinbanden auf ihr deutlich sichtbar waren.

5.7.5 Gesamtproteinnachweis durch Anfärben des SDS-Geles

Die Gesamtheit der Proteinbanden wurde durch Anfärben mit Coomassie-Brilliant-blue sichtbar gemacht. Das Gel wurde in die Färbelösung eingelegt und kurz aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Gel so lange in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden deutlich sichtbar waren. Das angefärbte Gel wurde auf ein feuchtes Blotting-Papier gelegt, mit einer Plastikfolie abgedeckt und unter dem Einfluss von Wärme und Druck getrocknet.

5.7.6 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels *GST pull-down-assays*

Beladung von Ras-GTPasen mit Nukleotiden

Um die direkte Interaktion von Ras-GTPasen mit potentiellen Effektor Proteinen zu untersuchen, wurden *GST pull-down assays* durchgeführt. Die Überexpression und Aufreinigung erfolgte wie bereits oben beschrieben, allerdings wurden die GTPasen nicht mittels einer GST-Säule, sondern mit loser GSH-Sepharose gereinigt. Nach der Reinigung wurden die Proteine nicht eluiert, sondern blieben an der GSH-Sepharose gebunden. Um eine Interaktion in Abhängigkeit vom GDP/GTP-Beladungszustand messen zu können, wurden die GTPasen mit GDP bzw. GTP beladen. Hierzu wurden die GTPasen mit Puffer gewaschen, der einen Überschuss an EDTA (10mM) enthält. Hierdurch werden die für die Nukleotidbindung notwendige Mg²⁺-Ionen komplexiert und damit das gebundene Nukleotid aus der GTPase gelöst. Um die GTPasen mit dem entsprechenden Nukleotid zu beladen, wurde ein Überschuss dieses Nukleotids (1mM

GDP bzw. 100nM GTPS) zu den nukleotidfreien GTPasen gegeben und für 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde ein Überschuss an Magnesium (25 mM) zugegeben, um das Nukleotid in der GTPase zu stabilisieren.

GST pulldown assay

Es wurden gleiche Volumina an GSH-Sepharose, an die die beladenen GTPasen gebunden wurden, mit 500 µg Proteinextrakt aus *U. maydis* gemischt und für 1h bei 4°C inkubiert. Hierbei wurde ein Überschuss an GDP (1mM) bzw. GTPS (100nM) zum Reaktionsansatz gegeben. Anschließend wurde die GSH-Sepharose 5x mit kaltem Waschpuffer (TBS mit 10 mM Magnesium) gewaschen. Die gewaschene GSH-Sepharose wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C inkubiert. Interagierende Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mittels Western Blot nachgewiesen.

5.8 *In vitro*-Untersuchung von Ras-Guanin-Nukleotid-

Austauschfaktoren

Um die Spezifität von Ras-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren gegenüber verschiedenen Ras-Proteinen zu bestimmen, wurde ihre Fähigkeit, den Austausch von GDP zu GTP zu katalysieren, *in vitro* analysiert. Zu diesem Zweck werden gereinigte Ras-Proteine mit gereinigten Ras-GTPasen inkubiert und dabei der Austausch von GDP zu GTP gemessen. Während klassische Methoden oftmals die Beladung der Ras-GTPasen mit radioaktiven Nukleotiden messen, kam in dieser Arbeit ein Fluoreszenzbasierter Test zum Einsatz. Hierzu wurde eine spezifische Eigenschaft des Nukleotid-Analogs 2'(3')-O-(N-Methylanthraniloyl)-GDP (mantGDP) genutzt. Dieses Nukleotid-Analog hat in wässriger Lösung eine relativ geringe Fluoreszenz, diese steigt aber bei Bindung an eine GTPase stark an. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um *in vitro* die Beladung der GTPasen mit diesem Nukleotid zu messen. Hierbei wird die GTPase in Anwesenheit eines GEFs und einem Überschuss an mantGDP inkubiert. Ist der GEF in der Lage, den Nukleotidaustausch an der entsprechenden GTPase zu katalysieren, wird das gebundene Nukleotid bevorzugt durch das im Überschuss vorhandene mantGDP ersetzt. Dieser Austausch lässt sich anhand der veränderten Fluoreszenz-Intensität fluorimetrisch messen. Eine parallel durchgeführte Kontrollreaktion ohne GEF erlaubt eine Bestimmung des spontanen Nukleotidaustauschs. Die *in vitro*-Untersuchungen

wurden in 96-Well Mikrotiterplatten mit Hilfe eines Tecan Safire Fluorimeters (Tecan, Crailsheim) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen GTPasen in GEF-Assay-Puffer, der 400 nM mantGDP enthielt, auf eine Endkonzentration von 2 μ M verdünnt. Aus diesem Ansatz wurde je ein Aliquot für die Mess- und die Kontrollreaktion in eine schwarze 96-Well-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) gegeben. Diese Reaktionsansätze wurden zunächst für 5 min inkubiert, hierbei wurde schon die Fluoreszenz in Abständen von 1 min gemessen. Anschließend wurde gereinigter GEF zugegeben und die Reaktionskinetik für 30-60 min gemessen. Die gewonnenen Daten wurden gegen die initiale Fluoreszenz normalisiert und mit Hilfe des Programms Sigmaplot graphisch ausgewertet. Die gezeigte Ausgleichskurve wurde durch die Funktion „fit to linear regression“ dargestellt.

5.9 Transformationen

5.9.1 Herstellung elektro-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektro-kompetenter *E. coli* wurden 2 ml einer ÜNK des Stammes DH5 α auf 200 ml dYT-Medium überimpft und in einem Schikane-Kolben bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 geschüttelt. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (10 min, 4500 rpm, 4°C, Laborzentrifuge). Das Zellsediment wurde nacheinander mit 200 ml und 50 ml sterilem H₂O sowie 5 ml und 2,5 ml 10 % Glycerin gewaschen und jeweils wie oben zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen, in Reaktionsgefäßen auf 50 μ l aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

5.9.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter DH5 α -*E. coli*-Zellen erfolgte nach der Methode von Inoue et al. (1990). 200 ml dYT-Medium wurden mit 2 ml Übernachtskultur des Stammes DH5 α inokuliert und in einem Schikanekolben bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation in Eiswasser für 10 min. Die Kultur wurde bei 4°C für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 80 ml Inoue-Puffer auf Eis resuspendiert und erneut mit den gleichen Einstellungen für 10 min zentrifugiert. Der

Überstand wurde wiederum verworfen und die Zellen in 20 ml Inoue-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von DMSO auf eine Endkonzentration von 7% wurden die Zellen zu je 100 µl in Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Um chemisch kompetente *E. coli*-Zellen des Stamms Top10 herzustellen, wurde die Kalzium-Mangan-Methode nach Hanahan et al. (1991) verwendet. Hierzu wurden die Zellen zunächst in SOB-Medium ohne Magnesium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 angezogen. Wenn die Kultur diese Zelldichte erreicht hatte, wurden die Zellen für 10 min in Eiswasser gekühlt und durch einen Zentrifugationsschritt geerntet. Die sedimentierten Zellen wurden in 1/3 Volumen eiskalten CCMB80-Puffer resuspendiert und für 20 min in einem Eis-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1/12 Volumen CCMB80-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

5.9.3 Elektro-Transformation von elektrokompenten *E. coli*-Zellen

Zur effizienten Transformation von DNA aus Ligations-Ansätzen in *E. coli* wurde häufig die Methode der Elektroporation gewählt. Hierbei wurden 50 µl elektrokompente *E. coli* mit 1 µl des Ligations-Ansatzes versetzt und 1 min auf Eis inkubiert, damit sich die DNA an die Zellen anlagern konnte. Anschließend wurde das Gemisch in eine Elektroporations- Kuvette überführt und bei 125 µF, 200 Ω und 2,5 kV elektroporiert (Gene Pulser, Fa. Biorad, München). Es wurde darauf geachtet, dass der ausgegebene Wert für τ bei 4,5 bis 4,7 ms lag. Die Zellen wurden in 1 ml 37°C warmen dYT-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. 50 bis 500 µl der Zellsuspension wurden auf dYT-Agar mit Ampicillin, falls nötig mit X-Gal, ausplattiert.

5.9.4 Transformation chemokompenten *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von DNA aus Ligations-Ansätzen in chemokompente *E. coli*-Zellen wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl chemokompenten Zellen versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 1 min auf 42°C gebracht und anschließend sofort mit 800 µl dYT-Medium versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C auf dem Schüttler bei 150 rpm. Anschließend wurden zwischen 100 und 200 µl des Ansatzes auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.9.5 Protoplastierung von *U. maydis*

Zur Herstellung von *U. maydis* - Protoplasten wurden eine Kultur in 50 ml YEPS-Medium bis zu einer OD600 von ca. 0,7 gezogen. Diese wurde zentrifugiert (3200 rpm, 10 min, 4°C, Laborzentrifuge) und das Zellsediment in 25 ml SCS-Lösung resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C, Laborzentrifuge) und das Pellet mit 2 ml SCS-Novozym- Lösung versetzt. Der Ansatz wurde bei 28°C inkubiert, bis ca. 80 % der Zellen als runde Protoplasten vorlagen (ca. 10 bis 45 min). Die Protoplastierung wurde durch Zugabe von 10 ml SCS-Lösung gestoppt und die Protoplasten pelletiert (2300 rpm, 10 min, 4°C, Laborzentrifuge). Das Zellsediment wurde vorsichtig nacheinander mit zweimal 10 ml SCS-Lösung und 10 ml STC-Lösung gewaschen und jeweils wie im vorhergehenden Schritt zentrifugiert. Die Protoplasten wurden in 500 µl STC-Lösung aufgenommen, auf 50 µl aliquotiert und im auf -80°C gelagert.

5.9.6 Transformation von *U. maydis*-Protoplasten

Zur Transformation von *U. maydis* wurden zu 50 µl Protoplasten-Suspension 500 ng bis 5 µg lineare oder Plasmid-DNA gegeben. Ebenso wurde jeweils eine Kontrolle mit gleichem Volumen an H₂O versetzt. Die Ansätze wurden für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl eiskalter STC/PEG-Lösung vermengt. Durch die Zugabe von PEG werden die Zellmembranen für die zugegebene DNA permeabel und diese kann in die Protoplasten aufgenommen werden. Die Gemische wurden weitere 15 min auf Eis inkubiert und anschließend auf Regenerations-Agar, bzw. YNB-Regenerationsagar mit Glukose bzw. Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle ausplattiert und unter der Sterilbank für ca. 20 min getrocknet. Die Platten enthielten als untere Schicht 10 ml Regenerations-Agar mit einer zweifachen Antibiotika-Konzentration (Hygromycin: 400 µg/ml, Carboxin 4 µg/ml, Nourseothricin: 300 µg/ml) und darüber 10 ml Regenerations-Agar ohne Antibiotikum (AB). So stellt sich in Folge der Diffusion auf der Oberfläche des Agars mit der Zeit die übliche Konzentration an AB ein, so dass vorher die Resistenz in den transformierten Protoplasten zur Ausprägung kommen kann. Die Platten wurden bei 28°C für zwei bis fünf Tage inkubiert und gebildete Kolonien auf PD-Agar bzw. YNB-G- oder YNB-A-Agar mit AB vereinzelt.

5.9.7 Integration von Vektoren in den genomischen *ip*-Locus

Der häufig zur Integration von Vektorkonstrukten genutzte *cbx*-Locus wird so genannt, da er Carboxinresistenz (CbxC) nach Integration spezieller Vektoren vermittelt. Der *cbx*-Locus wird auch *ip*-Locus genannt. Diese speziellen Vektoren tragen ein Carboxinresistenz vermittelndes Allel des *ip*-Gens. Carboxin ist ein Fungizid, das die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase inhibiert. Das vektorkodierte IP-Protein wird nicht durch das Fungizid inhibiert und vermittelt dadurch die Carboxinresistenz. Der Vektor kann durch *Ssp*I in dem *ip*-Allel linearisiert werden und nach der Transformation durch ortsspezifische, homologe Rekombination in den genomischen *ip*-Locus integrieren. Der *ip*-Locus wird durch die Integration des Vektors verdoppelt (Abb. 36). Durch die in der Abbildung 36 dargestellten Primerkombinationen kann die Integration des Konstruktes überprüft werden (Hlubek, 2004).

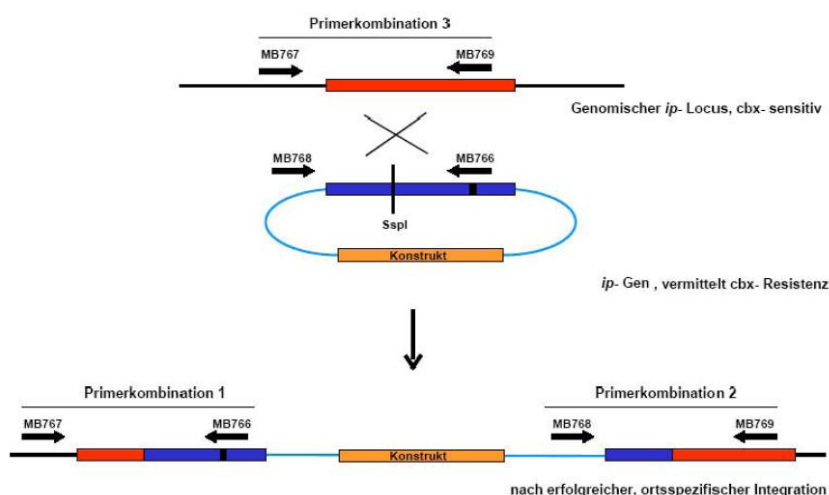


Abbildung 43: Integration von Plasmiden in den genomischen *ip*-Locus

Die verwendeten Plasmide tragen neben den erstellten Konstrukten das *ipr*-Allel, welches nach Linearisierung mit dem genomischen *ips*-Allel rekombiniert. Ein erfolgreiches Integrationsereignis kann mit Hilfe der angegebenen Primerkombinationen überprüft werden.

5.10 Mikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse von *U. maydis* kam ein Fluoreszenzmikroskop des Typs Axioskop 2 (Firma Zeiss) zum Einsatz. Für die Mikroskopie wurden 5 µl einer frischen Übernachtskultur auf einen mit 1,5 % Agarose

beschichteten Objektträger aufgetropft und dieser mit einem Deckglas versehen. Die Mikroskopie erfolgte unter DIC-Belichtung oder mittels Epifluoreszenz. Hierbei wurden folgende Filtersätze verwendet: DAPI (Anregung: 365 nm, Farbteiler: 395 nm, Emission: >397 nm), FITC (Anregung: 450-490 nm, Farbteiler: 510 nm, Emission: 515-565 nm), Rhodamin (Anregung: 546 nm, Farbteiler: 580 nm, Emission: >590 nm). Aufnahmen wurden mit einer Kamera der Firma Hamamatsu (Typ Orca-ER) und der Software Volocity (Improvision) erstellt. Kontrastverstärkung, Skalierung von Maßstäben, die Vergrößerung von Bildausschnitten und die farbliche Überlagerung von Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ durchgeführt.

Färbungen

Folgende Fluoreszenz-Farbstoffe wurden für die Mikroskopie eingesetzt:

Tab. 4.9: Verwendete Farbstoffe.

Farbstoff	Anregung (nm)	Emission (nm)	Verwendete Konzentration
Calcofluor white		395 440	2 µg/ml
DAPI		358 461	2 µg/ml
SYTO11		508 527	5 nM
FM4-64		508 640	16 µM
CMAC		350 466	100 µM
GFP		475 508	-

Kernfärbung

Für die Kernfärbung mittels DAPI wurden Übernachtskulturen abzentrifugiert in der Tischzentrifuge bei 5000 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und in 70 % Ethanol in 1 x PBS resuspendiert, um sie zu fixieren. Anschließend wurden sie in 1 x PBS gewaschen und mit 2 µg/ml DAPI versehen. Die Färbung wurde mit dem DAPI-Filter betrachtet. Alternativ wurden die Kerne durch Zugabe von 5 nM SYTO11 zu den auf den Objektträger aufgebraachten Zellen einer Übernachtskultur gefärbt.

Septen- und Zellwandfärbung

Für die Visualisierung der Septen und der Zellwand Zellwandfärbung wurde der Farbstoff Calcofluor white sowie WGA (wheat germ agglutinin) verwendet. Calcofluor white färbt neu gebildetes Zellwandmaterial (Mitchison and Nurse, 1985). Es wurde in Konzentrationen von 2 µg/ml zu frischen Übernachtskulturen zugegeben. Nach 10

Minuten Inkubation wurden die Zellen auf einen Objektträger gegeben und im Lichtmikroskop mit DAPI-Filtersatz betrachtet. Rhodamin-gekoppeltes WGA ist ein spezifischer Farbstoff für Chitin (Nagata and Burger, 1974). Die Färbung erfolgte mit 25 µg/ml für 5 min und anschließender Betrachtung mit dem Rhodamin-Filtersatz.

Vakuolenfärbung

Vakuolen wurden mit CellTrackerTMblue (CMAC) gefärbt. Hierfür wurde eine frische Übernachtskultur mit 100 µM CMAC versehen und für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem DAPI-Filtersatz betrachtet. Bei gleichzeitiger Färbung mit dem Farbstoff FM4-64 wurde die FM4-64-Färbung wie beschrieben durchgeführt und nach Ablauf von 45 Minuten der Farbstoff CMAC in der angegebenen Konzentration zugesetzt.

Endozytosefärbung

Zellen aus einer logarithmischen Kultur wurden für 1-3 min mit 16 µM FM4-64 (Vida and Emr, 1995) bei RT gefärbt (Puls). Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei 5000 rpm pelletiert und in Wasser resuspendiert. Nach 60 min (chase) wurden die Zellen auf einen Objektträger gegeben und mit dem Rhodamin- Filtersatz betrachtet. Um die Endozytose zeitlich zu verfolgen, wurden die Zellen wie oben beschrieben gefärbt und nach der Resuspendierung in Wasser unverzüglich auf den Objektträger gegeben. Der Verlauf der Endozytose konnte dann in zeitlich definierten Abständen verfolgt werden.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kleine GTPasen sind molekulare Schalter	2
Abbildung 2: Switch Regionen der RhoGTPasen (Hakoshima, 2003)	3
Abbildung 3: Effektoren humaner RasGTPasen	6
Abbildung 4: Intrazelluläre Lokalisation humaner RasGTPasen	8
Abbildung 5: Signalweiterleitung von RasGTPasen bei <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> und <i>C. neoformans</i>	10
Abbildung 6: <i>U. maydis</i> induzierte Gallen an Blättern, Kolben und Stängeln	13
Abbildung 7: Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> (Müller, 2003)	14
Abbildung 8: Genetische Regulation des Kreuzungsvorgangs	16
Abbildung 9: Phänotypen von Ras1-Mutanten (M. Mahler, 2006)	17
Abbildung 10: Phänotypische Auswirkung von <i>rac1</i> -Mutanten in <i>U. maydis</i> (Mahler et al., 2006)	19
Abbildung 11: Model der Rac1 Aktivierung an der Zellspitze (Sonja Frieser, unveröffentlichte Daten)	21
Abbildung 12: Die Organisation des Zytoskeletts ist in dem konditionalen Ras1-Stamm deutlich dereguliert	24
Abbildung 13: Überexpression dominant aktiver <i>ras1</i> -Allele	26
Abbildung 14: Interaktionsnachweis von RasGTPasen mit Uac1	28
Abbildung 15: Expressionsanalyse des Reportergens <i>frb34</i>	29
Abbildung 16: Interaktionsnachweis von Ras1GTP mit Kpp4	31
Abbildung 17: Untersuchung der Cdc24GFP Stabilität nach Überexpression von <i>ras1</i> und <i>ras1^{G18V}</i>	32
Abbildung 18: Lokalisation von Cdc24GFP nach Überexpression von <i>ras1^{G18V}</i>	33
Abbildung 19: Interaktionsnachweis zwischen Ras1 und Cdc24	34
Abbildung 20: Kpp4 ist essentiell für die Filamentbildung nach Überexpression von <i>ras1</i> oder <i>rac1</i>	35
Abbildung 21: Die Überexpression von <i>ras1</i> oder <i>rac1</i> induziert in Δ <i>fuz7</i> -Zellen kein filamentöses Wachstum	36
Abbildung 22: Ubc2 interagiert mit Rac1 und mit Cdc42	37
Abbildung 23: Ras1 ^{G18V} rekrutiert Cdc24GFP in Δ <i>ubc2</i> -Stämmen nicht an die Zytoplasmamembran	38
Abbildung 24: Alignment der C-terminalen Aminosäuren von RasGTPasen	39

Abbildung 25: Die C-terminale Palmitoylierungssequenz ist für die Lokalisation von Ras1 an der Zytoplasmamembran notwendig	40
Abbildung 26: Die Überexpression von <i>ras1^{CCSS}</i> supprimiert die Depletion von Ras1	42
Abbildung 27: Tropftest des komplementierten Ras1 _{kond} -Stammes und des Ras1 _{CCSSend} -Stammes	43
Abbildung 28: Analyse der Kernverteilung, der Vakuolenmorphologie und des Tubulinzytoskeletts des Ras1 _{CCSSend} -Stammes	44
Abbildung 29: Die Überexpression von Rac1 führt ohne Palmitoylierung von Ras1 nicht zu filamentösem Wachstum	45
Abbildung 30: Palmitoylierung von Ras1 ist notwendig für b induzierte Filamentbildung	46
Abbildung 31: Überexpression von Ras1 ^{G18VCCSS} führt zur Degradation von Cdc24GFP	48
Abbildung 32: Überexpression von <i>ras1^{G18VCCSS}</i> führt zur Lokalisation von Cdc24GFP an Endomembranen und an Septen	49
Abbildung 33: RA-Domänen enthaltende Proteine in <i>U. maydis</i>	50
Abbildung 34: Schematische Darstellung des <i>in vitro</i> GEF-Assays	51
Abbildung 35: GEF-Assay zur Analyse der GEF-Spezifität von Sql2 und Tfh1	52
Abbildung 36: Überexpression von Sql2 führt zur Degradation von Cdc24GFP	53
Abbildung 37: Überexpression des Ras1- spezifischen GEFs Tfh1	54
Abbildung 38: Tfh1 aktiviert das Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1-Signalmodul	55
Abbildung 39: Ale1 kann den Nukleotidaustausch an Ras2 katalysieren	56
Abbildung 40: Modell zur Ausbildung eines höheren Proteinkomplexes	59
Abbildung 41: Modell zur Aktivierung des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem2-Signalmoduls durch Ras168	
Abbildung 42: Modell der Ras1 regulierten Signalwege	69
Abbildung 43: Integration von Plasmiden in den genomischen <i>ip</i> -Locus	112

Literaturverzeichnis

- Anand Apte B, Zetter B (1997) Signaling Mechanisms in Growth Factor Stimulated Cell Motility. *Stem Cells* **15**(4): 259-267
- Andrews D, Egan J, Mayorga M, Gold S (2000) The *Ustilago maydis* *ubc 4* and *ubc 5* Genes Encode Members of a MAP Kinase Cascade Required for Filamentous Growth. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**(7): 781-786
- Banuett F (1992) *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends in Genetics* **8**(5): 174-180
- Banuett F, Herskowitz I (1989) Different Alleles of *Ustilago maydis* are Necessary for Maintenance of Filamentous Growth but not for Meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**(15): 5878-5882
- Banuett F, Herskowitz I (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**(10): 2965
- Barbieri MA, Kohn AD, Roth RA, Stahl PD (1998) Protein kinase B/akt and rab5 mediate Ras activation of endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* **273**(31): 19367
- Berrier A, Mastrangelo A, Downward J, Ginsberg M, LaFlamme S (2000) Activated R-Ras, Rac1, PI 3-Kinase and PKC? Can Each Restore Cell Spreading Inhibited by Isolated Integrin $\beta 1$ Cytoplasmic Domains. *The Journal of Cell Biology* **151**(7): 1549-1560
- Bishop A, Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348**(2): 241-255
- Bluhm BH, Zhao X, Flaherty JE, Xu JR, Dunkle LD (2007) RAS2 regulates growth and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**(6): 627-636
- Boelker M, Urban M, Kahmann R (1992) The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**: 441-450
- Boettner B, Harjes P, Ishimaru S, Heke M, Fan H, Qin Y, Van Aelst L, Gaul U (2003) The AF-6 Homolog Canoe Acts as a Rap1 Effector During Dorsal Closure of the *Drosophila* Embryo. *Genetics* **165**(1): 159-169
- Boettner B, Van Aelst L (2002) The RASputin effect. *Genes & Development* **16**(16): 2033
- Bölker M, Urban M, Kahmann R (1992) The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**(3): 441-450
- Bourne H, Sanders D, McCormick F (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**: 125-132
- Bourne H, Sanders D, McCormick F (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-127
- Boyartchuk V, Ashby M, Rine J (1997) Modulation of Ras and *a*-factor function by carboxyl-terminal proteolysis. *Science* **275**(5307): 1796-1800

Boyce K, Hynes M, Andrianopoulos A (2003) Control of morphogenesis and actin localization by the *Penicillium marneffe* RAC homolog. *Journal of Cell Science* **116**(7): 1249-1260

Brachmann A, Weinzierl G, Kamper J, Kahmann R (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **42**(4): 1047-1063

Brown J, Stowers L, Baer M, Trejo J, Coughlin S, Chant J (1996) Human Ste20 homologue hPAK1 links GTPases to the JNK MAP kinase pathway. *Curr Biol* **6**: 598-605

Buchsbaum R, Connolly B, Feig L (2003) Regulation of p70 S6 Kinase by Complex Formation between the Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor (Rac-GEF) Tiam1 and the Scaffold Spinophilin*. *Journal of Biological Chemistry* **278**(21): 18833-18841

Casey P, Seabra M (1996) Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* **271**(10): 5289-5292

Chang EC, Barr M, Wang Y, Jung V, Xu HP, Wigler MH (1994) Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell* **79**(1): 131-141

Chen C, Dickman M (2004) Dominant active Rac and dominant negative Rac revert the dominant active Ras phenotype in *Colletotrichum trifolii* by distinct signalling pathways. *Molecular Microbiology* **51**(5): 1493-1507

Christensen J (1963) *Corn Smut Caused by Ustilago Maydis*: American Phytopathological Society.

Clark E, King W, Brugge J, Symons M, Hynes R (1998) Integrin-mediated Signals Regulated by Members of the Rho Family of GTPases. *The Journal of Cell Biology* **142**(2): 573-586

Clarke S, Vogel J, Deschenes R, Stock J (1988) Posttranslational Modification of the Ha-ras Oncogene Protein: Evidence for a Third Class of Protein Carboxyl Methyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**(13): 4643-4647

Dai Q, Choy E, Chiu V, Romano J, Slivka S, Steitz S, Michaelis S, Philips M (1998) Mammalian Prenylcysteine Carboxyl Methyltransferase Is in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **273**(24): 15030-15034

Dechant R, Binda M, Lee SS, Pelet S, Winderickx J, Peter M (2010) Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *The EMBO Journal* **29**(15): 2515-2526

Didsbury J, Weber R, Bokoch G, Evans T, Snyderman R (1989) rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *Journal of Biological Chemistry* **264**(28): 16378-16382

Fang HM, Wang Y (2006) RA domain mediated interaction of Cdc35 with Ras1 is essential for increasing cellular cAMP level for *Candida albicans* hyphal development. *Molecular Microbiology* **61**(2): 484-496

Feig L (2003) Ral-GTPases: approaching their 15 minutes of fame. *Trends Cell Biol* **13**(8): 419-425

Feig L, Cooper G (1988) Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Molecular and Cellular Biology* **8**(8): 3235-3243

Fenteany G, Janmey P, Stossel T (2000) Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets. *Current Biology* **10**(14): 831-838

Field J, Nikawa JI, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, Lerner RA, Wigler M (1988) Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Molecular and Cellular Biology* **8**(5): 2159

Folch-Mallol JL, Martinez LM, Casas SJ, Yang R, Martinez-Anaya C, Lopez L, Hernandez A, Nieto-Sotelo J (2004) CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY-New roles for CDC25 in growth control, galactose regulation and cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology-Reading* **150**(9): 2865-2880

Fortwendel JR, Fuller KK, Stephens TJ, Bacon WC, Askew DS, Rhodes JC (2008) *Aspergillus fumigatus* RasA regulates asexual development and cell wall integrity. *Eukaryotic Cell* **7**(9): 1530

Fortwendel JR, Panepinto JC, Seitz AE, Askew DS, Rhodes JC (2004) *Aspergillus fumigatus* rasA and rasB regulate the timing and morphology of asexual development. *Fungal Genetics and Biology* **41**(2): 129-139

Fukata M, Kuroda S, Fujii K, Nakamura T, Shoji I, Matsuura Y, Okawa K, Iwamatsu A, Kikuchi A, Kaibuchi K (1997) Regulation of Cross-linking of Actin Filament by IQGAP1, a Target for Cdc42. *Journal of Biological Chemistry* **272**(47): 29579-29583

Fukui Y, Kozasa T, Kaziro Y, Takeda T, Yamamoto M (1986) Role of a ras homolog in the life cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell* **44**(2): 329-336

Fukumoto Y, Kaibuchi K, Hori Y, Fujioka H, Araki S, Ueda T, Kikuchi A, Takai Y (1990) Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* **5**(9): 1321-1328

García-Muse T, Steinberg G, Pérez-Martín J (2003) Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* **2**(3): 494

Garnett M, Marais R (2004) Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. *Cancer Cell* **6**(313): 9

Gibbs J, Sigal I, Poe M, Scolnick E (1984) Intrinsic GTPase Activity Distinguishes Normal and Oncogenic ras p21 Molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**(18): 5704-5708

Glomset J, Farnsworth C (1994) Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol* **10**: 181-205

Gold S, Duncan G, Barrett K, Kronstad J (1994) cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes & Development* **8**(23): 2805-2816

Golovanov A, Chuang T, DerMardirossian C, Barsukov I, Hawkins D, Badii R, Bokoch G, Lian L, Roberts G (2001) Structure-activity relationships in flexible protein domains: regulation of rho GTPases by RhoGDI and D4 GDI. *J Mol Biol* **305**(1): 121-135

Gorfer M, Tarkka M, Hanif M, Pardo A, Laitinen E, Raudaskoski M (2001) Characterization of Small GTPases Cdc 42 and Rac and the Relationship Between Cdc 42 and Actin Cytoskeleton in Vegetative and Ectomycorrhizal Hyphae of *Suillus bovinus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**(2): 135-144

Haataja L, Groffen J, Heisterkamp N (1997) Characterization of RAC3, a Novel Member of the Rho Family. *Journal of Biological Chemistry* **272**(33): 20384-20388

Hall A (1990) The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**(4969): 635

Han L, Wong D, Dhaka A, Afar D, White M, Xie W, Herschman H, Witte O, Colicelli J (1997) Protein binding and signaling properties of RIN1 suggest a unique effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(10): 4954

Hancock J, Paterson H, Marshall C (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**(133): 9

Hartmann H, Kahmann R, Bölker M (1996) The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**(7): 1632-1641

Hlubek A, Schink KO, Mahlert M, Sandrock B, Bölker M (2008) Selective activation by the guanine nucleotide exchange factor Don1 is a main determinant of Cdc42 signalling specificity in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **68**(3): 615-623

Hrycyna C, Sapperstein S, Clarke S, Michaelis S (1991) The *Saccharomyces cerevisiae* STE14 gene encodes a methyltransferase that mediates C-terminal methylation of a-factor and RAS proteins. *EMBO J* **10**(7): 1699-1709

Huang P, Han J, Hui L (2011) MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. *Protein & Cell* **1**(3): 218-226

Hurtado C, Beckerich J, Gaillardin C, Rachubinski R (2000) A Rac Homolog Is Required for Induction of Hyphal Growth in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology* **182**(9): 2376-2386

Ihara K, Muraguchi S, Kato M, Shimizu T, Shirakawa M, Kuroda S, Kaibuchi K, Hakoshima T (1998) Crystal Structure of Human RhoA in a Dominantly Active Form Complexed with a GTP Analogue. *Journal of Biological Chemistry* **273**(16): 9656-9666

Jensen S, Geymonat M, Johnson AL, Segal M, Johnston LH (2002) Spatial regulation of the guanine nucleotide exchange factor Lte1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science* **115**: 4977-4991

Joyce D, Bouzahzah B, Fu M, Albanese C, D'Amico M, Steer J, Klein J, Lee R, Segall J, Westwick J (1999) Integration of Rac-dependent Regulation of Cyclin D1 Transcription through a Nuclear Factor- κ B-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **274**(36): 25245-25249

Kae H, Kortholt A, Rehmann H, Insall RH, Van Haastert PJM, Spiegelman GB, Weeks G (2007) Cyclic AMP signalling in Dictyostelium: G-proteins activate separate Ras pathways using specific RasGEFs. *EMBO Reports* **8**(5): 477-482

Kaffarnik F (2003) PKA and MAPK phosphorylation of Prf 1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *The EMBO Journal* **22**(21): 5817-5826

Kahmann R, Basse C, Feldbrügge M (1999) Fungal-plant signalling in the *Ustilago maydis*-maize pathosystem. *Current opinion in microbiology* **2**(6): 647-650

Kämper J, Reichmann M, Romeis T, Bölker M, Kahmann R (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**(1): 73-83

Kataoka T, Powers S, McGill C, Fasano O, Strathern J, Broach J, Wigler M (1984) Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. *Cell* **37**(2): 437-445

Kawasaki T, Henmi K, Ono E, Hatakeyama S, Iwano M, Satoh H, Shimamoto K (1999) The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(19): 10922

Klosterman SJ, Martinez-Espinoza AD, Andrews DL, Seay JR, Gold SE (2008) Ubc2, an ortholog of the yeast Ste50p adaptor, possesses a basidiomycete-specific carboxy terminal extension essential for pathogenicity independent of pheromone response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**(1): 110-121

Kübler E, Mösch HU, Rupp S, Lisanti MP (1997) Gpa2p, a G-protein -subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **272**(33): 20321

Lamarche N, Hall A (1994) GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet* **10**(12): 436-440

Lee N, Kronstad J (2002) ras2 Controls Morphogenesis, Pheromone Response, and Pathogenicity in the Fungal Pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* **1**(6): 954-966

Lemmon M, Ferguson K (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* **350**(1)

Leveleki L, Mahlert M, Sandrock B, Bolker M (2004) The PAK family kinase Cla 4 is required for budding and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **54**(2): 396-406

Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, Bar-Sagi D, Margolis B, Schlessinger J (1993) Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* **363** **85**: 88

Li R, Bowerman B (2010) Symmetry breaking in biology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**(3)

Lim K, Baines A, Fiordalisi J, Shipitsin M, Feig L, Cox A, Der C, Counter C (2005) Activation of RalA is critical for Ras-induced tumorigenesis of human cells. *Cancer Cell* **7**(6): 533-545

Lobo S, Greentree W, Linder M, Deschenes R (2002) Identification of a Ras Palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **277**(43): 41268-41273

Lorenz MC, Heitman J (1997) Yeast pseudohyphal growth is regulated by GPA2, a G protein homolog. *The EMBO Journal* **16**(23): 7008-7018

Magee A, Newman C, Giannakouros T, Hancock J, Fawell E, Armstrong J (1992) Lipid modifications and function of the ras superfamily of proteins. *Biochem Soc Trans* **20**(2): 497-499

Mahlert M (2006) Charakterisierung kleiner G-Proteine der Ras- und Rho/Rac-Familie in *Ustilago maydis*: Zentrale Schalter in komplexen Netzwerken und ihr Einfluss auf die Organisation der Zellmorphologie. Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg,

Mahlert M, Leveleki L, Hlubek A, Sandrock B, Bolker M (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **59**(2): 567-578

Mayorga M, Gold S (1998) Characterization and Molecular Genetic Complementation of Mutants Affecting Dimorphism in the Fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* **24**(3): 364-376

Mayorga M, Gold S (2001) The *ubc 2* gene of *Ustilago maydis* encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. *Molecular Microbiology* **41**(6): 1365-1379

McCormick F, Wittinghofer A (1996) Interactions between Ras proteins and their effectors. *Curr Opin Biotechnol* **7**(4): 449-456

Milburn M, Tong L, deVos A, Brunger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, Kim S (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* **247**(4945): 939

Mionnet C, Bogliolo S, Arkowitz RA (2008) Oligomerization regulates the localization of Cdc24, the Cdc42 activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **283**(25): 17515

Mitin N, Ramocki M, Zullo A, Der C, Konieczny S, Taparowsky E (2004) Identification and Characterization of Rain, a Novel Ras-interacting Protein with a Unique Subcellular Localization. *Journal of Biological Chemistry* **279**(21): 22353-22361

Mösch H, Fink G (1997) Dissection of Filamentous Growth by Transposon Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **145**(3): 671-684

Mösch HU, Kubler E, Krappmann S, Fink GR, Braus GH (1999) Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **10**(5): 1325

Mösch HU, Roberts RL, Fink GR (1996) Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(11): 5352

Müller P (2003) Signalweiterleitung in *Ustilago maydis*: Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade kontrolliert Pheromonantwort und pathogene Entwicklung. Genetik, Phillips-Universität, Marburg/Lahn

Müller P, Katzenberger J, Loubradou G, Kahmann R (2003) Guanyl Nucleotide Exchange Factor Ssl2 and Ras2 Regulate Filamentous Growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* **2**(3): 609-617

Neal SE, Eccleston JF, Webb MR (1990) Hydrolysis of GTP by p21^{NRAS}, the NRAS protooncogene product, is accompanied by a conformational change in the wild-type protein: use of a single fluorescent probe at the catalytic site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(9): 3562

Nichols CB, Ferreyra J, Ballou ER, Alspaugh JA (2009) Subcellular localization directs signaling specificity of the *Cryptococcus neoformans* Ras1 protein. *Eukaryotic Cell* **8**(2): 181

Nichols CB, Perfect ZH, Alspaugh JA (2007) A Ras1-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* **63**(4): 1118-1130

Nobes CD, Hall A (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *The Journal of Cell Biology* **144**(6): 1235

Olivier J, Raabe T, Henkemeyer M, Dickson B, Mbamalu G, Margolis B, Schlessinger J, Hafen E, Pawson T (1993) A Drosophila SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* **73**(1): 179-191

Onken B, Wiener H, Philips M, Chang E (2006) Compartmentalized signaling of Ras in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(24): 9045

Pai E, Kabsch W, Krengel U, Holmes K, John J, Wittinghofer A (1989) Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**: 209-214

Papadaki P, Pizon V, Onken B, Chang EC (2002) Two ras pathways in fission yeast are differentially regulated by two ras guanine nucleotide exchange factors. *Molecular and Cellular Biology* **22**(13): 4598

Park HO, Kang PJ, Rachfal AW (2002) Localization of the Rsr1/Bud1 GTPase involved in selection of a proper growth site in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **277**(30): 26721

Patzak S (2007) Regulation der Zellknospung durch Rsr1 in *Ustilago maydis*. Diploma Thesis, Molekulargenetik, Philipps-Universität Marburg, Marburg

Pham CD, Yu Z, Sandrock B, Bolker M, Gold SE, Perlin MH (2009) *Ustilago maydis* rho1 and 14-3-3 homologues participate in pathways controlling cell separation and cell polarity. *Eukaryotic Cell* **8**(7): 977

Ponting C, Benjamin D (1996) A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci* **21**(11): 422-425

Price L, Leng J, Schwartz M, Bokoch G (1998) Activation of Rac and Cdc42 by Integrins Mediates Cell Spreading. *Molecular Biology of the Cell* **9**(7): 1863-1871

Prior IA, Hancock JF (2001) Compartmentalization of Ras proteins. *Journal of Cell Science* **114**(9): 1603-1608

Ramer SW, Davis RW (1993) A dominant truncation allele identifies a gene, STE20, that encodes a putative protein kinase necessary for mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(2): 452

Rebecchi M, Scarlata S (1998) PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAINS: A Common Fold with Diverse Functions. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **27**(1): 503-528

Ren X, Schwartz M (1998) Regulation of inositol lipid kinases by Rho and Rac. *Curr Opin Genet Dev* **8**(1): 63-67

Ridley A, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**(3): 389-399

Roberts R, Fink G (1994) Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes & Development* **8**(24): 2974-2985

Rocks O, Peyker A, Kahms M, Verveer P, Koerner C, Lumbierres M, Kuhlmann J, Waldmann H, Wittinghofer A, Bastiaens P (2005) An Acylation Cycle Regulates Localization and Activity of Palmitoylated Ras Isoforms. *Science* **307**(5716): 1746-1752

Rodriguez-Viciano P, Warne P, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry M, Waterfield M, Downward J (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras. *Nature* **370**: 527-532

Rolland F, de Winde JH, Lemaire K, Boles E, Thevelein JM, Winderickx J (2000) Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Molecular Microbiology* **38**(2): 348-358

Rotblat B, Prior IA, Muncke C, Parton RG, Kloog Y, Henis YI, Hancock JF (2004) Three separable domains regulate GTP-dependent association of H-ras with the plasma membrane. *Molecular and Cellular Biology* **24**(15): 6799

Roy S, Plowman S, Rotblat B, Prior IA, Muncke C, Grainger S, Parton RG, Henis YI, Kloog Y, Hancock JF (2005) Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Molecular and Cellular Biology* **25**(15): 6722

Santangelo GM (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* **70**(1): 253

Sasaki T, Kikuchi A, Araki S, Hata Y, Isomura M, Kuroda S, Takai Y (1990) Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **265**(4): 2333-2337

Schink KO (2010) Funktionelle Analyse von Rho-spezifischen Guaninnukleotidaustauschfaktoren in *Ustilago maydis*. Universitätsbibliothek Marburg,

Schmidt A, Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & Development* **16**(13): 1587-1609

Schulz B, Banuett F, Dahl M, Schlesinger R, Schäfer W, Martin T, Herskowitz I, Kahmann R (1990) The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**(2): 295-306

Shimada Y, Gulli MP, Peter M (2000) Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nature Cell Biology* **2**(2): 117-124

Shirsat N, Pignolo R, Kreider B, Rovera G (1990) A member of the ras gene superfamily is specifically expressed in T, B and myeloid hemopoietic cells. *Oncogene* **5**: 769-772

Smith D, Garcia-Pedrajas M, Hong W, Yu Z, Gold S, Perlin M (2004) An ste20 Homologue in *Ustilago maydis* Plays a Role in Mating and Pathogenicity. *Eukaryotic Cell* **3**(1): 180-189

Snetselaar K, Bolker M, Kahmann R (1996) *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol* **20**(4): 299-312

Snetselaar K, Mims C (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**(2): 193-203

Snetselaar KM, KM, Mims C (1993) Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**: 843-850

Spellig T, Bölker M, Lottspeich F, Frank R, Kahmann R (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**(7): 1620-1627

Steinberg G, Schliwa M, Lehmler C, Bölker M, Kahmann R, McIntosh JR (1998) Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *Journal of Cell Science* **111**: 2235

Takai Y, Kaibuchi K, Kikuchi A (1992) Kawata T (1992): Small GTP-binding proteins. *Int Rev Cytol* **133**: 187-230

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-Binding Proteins. *Physiological Reviews* **81**(1): 153-208

Toda T, Uno I, Ishikawa T, Powers S, Kataoka T, Broek D, Cameron S, Broach J, Matsumoto K, Wigler M (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* **40**(1): 27-36

Tolias K, Hartwig J, Ishihara H, Shibasaki Y, Cantley L, Carpenter C (2000) Type Ia phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Current Biology* **10**(3): 153-156

Truckses D, Bloomekatzs J, Thorner J (2004) The RA Domain of Ste50 Adaptor Protein Is Required for Delivery of Ste11 to the Plasma Membrane in the Filamentous Growth Signaling Pathway of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Molecular and Cellular Biology* **26**(3): 912-928

Tudzynski P, Scheffer J (2004) Pathogen profile *Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. *Molecular Plant Pathology* **5**(5): 377

Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C (1991) The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **30**(19): 4637-4648

Vallim M, Nichols C, Fernandes L, Cramer K, Alspaugh J (2005) A Rac Homolog Functions Downstream of Ras1 To Control Hyphal Differentiation and High-Temperature Growth in the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **4**(6): 1066-1078

Van Aelst L, Joneson T, Bar-Sagi D (1996) Identification of a novel Rac1-interacting protein involved in membrane ruffling. *EMBO J* **15**(15): 3778-3786

Wang Y, Xu HP, Riggs M, Rodgers L, Wigler M (1991) *byr2*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a protein kinase capable of partial suppression of the *ras1* mutant phenotype. *Molecular and Cellular Biology* **11**(7): 3554

Weeks G, Spiegelman GB (2003) Roles played by Ras subfamily proteins in the cell and developmental biology of microorganisms. *Cellular signalling* **15**(10): 901-909

Wei Y, Zhang Y, Derewenda U, Liu X, Minor W, Nakamoto R, Somlyo A, Somlyo A, Derewenda Z (1997) Crystal structure of RhoA- GDP and its functional implications. *Nature Structural Biology* **4**: 699-703

Welch H, Coadwell W, Stephens L, Hawkins P (2003) Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett* **546**(1): 93-97

Wennerberg K, Der CJ (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of Cell Science* **117**(8): 1301-1312

West M, Kung H, Kamata T (1990) A novel membrane factor stimulates guanine nucleotide exchange reaction of ras proteins. *FEBS letters* **259**(2): 245-248

Westwick J, Lambert Q, Clark G, Symons M, Van Aelst L, Pestell R, Der C (1997) Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Molecular and Cellular Biology* **17**(3): 1324-1335

Wittkowski K (2007) Charakterisierung von Ras-Guaninnukleotidaustauschfaktoren in *Ustilago maydis*. Bachelor Thesis, Molekulargenetik, Philipps-Universität Marburg, Marburg/Lahn

Xu K, Chong DC, Rankin SA, Zorn AM, Cleaver O (2009) Rasip1 is required for endothelial cell motility, angiogenesis and vessel formation. *Developmental biology* **329**(2): 269-279

Zarnack K, Eichhorn H, Kahmann R, Feldbrügge M (2008) Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Molecular Microbiology* **69**(4): 1041-1053

Zhang F, Casey P (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**: 241-269

Zheng Y, Bender A, Cerione RA (1995) Interactions among proteins involved in bud-site selection and bud-site assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **270**(2): 626

Ziman M, Johnson DI (1994) Genetic evidence for a functional interaction between *Saccharomyces cerevisiae* CDC24 and CDC42. *Yeast* **10**(4): 463-474

Ziman M, O'Brien J, Ouellette L, Church W, Johnson D (1991) Mutational analysis of CDC42Sc, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Molecular and Cellular Biology* **11**(7): 3537-3544

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Bölker bedanken, dass er es mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit in seinem Labor anfertigen, sowie für die vielen hilfreichen Diskussionen und Ideen, die zur Entwicklung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. Susanne Önel möchte ich mich bedanken, dass sie sich bereit erklärt hat, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen, sowie bei Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch und Prof. Dr. Alfred Batschauer für ihre Bereitschaft, der Prüfungskommission anzugehören.

Ein ganz besonderer Dank geht natürlich an die Mitglieder und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe: Björn Sandrock, Michael Mahler, Andrea Hlubek, Kay Schink, Beate Teichmann, Christan Böhmer, Sonja Frieser, Britta Tillmann, Johannes Freitag, Darius Stausberg, Michaela Wehr, Nicole Gutjahr, Florian Rosenthal, Sabrina Patzak, Lidan Liu, Marisa Piscator, Ute Kämper, Kathrin Wittkowski und Annemarie Heskamp für die hervorragende Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung und nicht zu vergessen die vielen Kaffee- und Schokopausen, die für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Auch der gesamten AG Mösch möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen lustigen Stunden, die wir zusammen verbracht haben, danken.

Danken möchte ich auch Beate, Andrea, Michael, Kay, Sonja, Britta, Sabrina, Johannes und Darius dafür, dass wir auch außerhalb vom Labor viel schöne Zeit verbracht haben.

Besonders möchte ich mich bei Johannes für die vielen Gespräche, die lustigen Pausen und für die unermüdliche Unterstützung beim Korrigieren dieser Arbeit bedanken.

Heide-Barbara Böttner, Birgit Niedziella und Hanne Steinebach möchte ich für die Unterstützung bei allem was zu organisieren war danken.

Mein besonderer Dank gilt Lars Hoffmann, der mir schon so lange zur Seite steht und immer für mich da ist und meinen Eltern, die mich während der ganzen Zeit unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Annette Bauer
Anschrift: Auf der Haide 18c
35043 Marburg-Cappel
Geburtsdatum: 29 Juni 1981,
Geburtsort: Neustadt an der Weinstraße

Ausbildung

2010-
2006-2010 Qualitätsmanagement-Beauftragte; CSL-Behring GmbH
Promotion; Philipps-Universität Marburg
Thema: „Die Rolle von Ras1 bei der Regulation des
polaren Wachstums in *Ustilago maydis*“
gefördert durch ein Promotionsstipendium der Philipps-
Universität Marburg
2005-2006 Diplomarbeit; Philipps-Universität Marburg;
Thema: „Identifizierung von Effektoren für GTPasen der
Ras- und Rac-Familie in *Ustilago maydis*“
2005 Diplomprüfung (Note: 1,1)
Fächer: Genetik, Mikrobiologie, Entwicklungsbiologie,
Zellbiologie
2001 – 2006 Diplomstudiengang Biologie; Philipps-Universität
Marburg
2000 – 2001 Praktikum; ddox GmbH, Aachen
1991 – 2000 Abitur; Max-Slevogt-Gymnasium, Landau
1997 – 1998 Auslandsaufenthalt; High School-Jahr, Azle, Texas, USA

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Annette Bauer, geboren am 29.06.1981 in Neustadt an der Weinstraße, dass ich meine Doktorarbeit mit dem Titel „Die Rolle von Ras1 bei der Regulation des polaren Wachstums in *Ustilago maydis*“ selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die Doktorarbeit wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner andern Hochschule eingereicht.

Ort; Datum

Annette Bauer
